

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-78990

(P2000-78990A)

(43) 公開日 平成12年3月21日 (2000.3.21)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 P 9/10		A 6 1 P 9/10	
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 9/64		C 1 2 N 9/64	Z
// A 6 1 K 38/46		A 6 1 P 7/02	

審査請求 有 請求項の数17 O L (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-209788	(71) 出願人	597055696
(62) 分割の表示	特願平2-505024の分割		ザ・ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバーシティ・オブ・テキサス・システム
(22) 出願日	平成2年3月1日 (1990.3.1)		アメリカ合衆国テキサス州オースティン・ウエストセブンスストリート201
(31) 優先権主張番号	3 1 9 2 1 2	(72) 発明者	ジョセフ・エフ・サンプルツク
(32) 優先日	平成1年3月6日 (1989.3.6)		アメリカ合衆国テキサス州75229ダラス・アービンシモンズドライブ4320
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(74) 代理人	100060782
(31) 優先権主張番号	4 3 4 7 4 8		弁理士 小田島 平吉
(32) 優先日	平成1年11月13日 (1989.11.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 t-P A変異体及びそれをコードする遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 t-P A変異体及びそれをコードする遺伝子を提供すること。

【解決手段】 t-P Aのセリンプロテアーゼインヒターによる阻害に対して抵抗性のt-P A変異体であって、t-P Aの304位置の塩基性アミノ酸が酸性アミノ酸又は中性アミノ酸により置換されているt-P A変異体及びそれをコードする遺伝子。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体であって、t-PAの304位置の塩基性アミノ酸が酸性アミノ酸又は中性アミノ酸により置換されているt-PA変異体。

【請求項2】 該t-PA変異体が304位置のア르기ニンがセリンで置換されているt-PA又は304位置のア르기ニンがグルタミン酸で置換されているt-PAである請求項1に記載のt-PA変異体。

【請求項3】 t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターがPAI-1、PAI-2及びPAI-3から成る群より選ばれた請求項1に記載のt-PA変異体。

【請求項4】 t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体であって、t-PAの304位置の塩基性アミノ酸が酸性アミノ酸又は中性アミノ酸により置換されているt-PA変異体をコードしている遺伝子。

【請求項5】 該t-PA変異体が304位置のア르기ニンがセリンで置換されているt-PA又は304位置のア르기ニンがグルタミン酸で置換されているt-PAである請求項4に記載の遺伝子。

【請求項6】 t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターがPAI-1、PAI-2及びPAI-3から成る群より選ばれた請求項4に記載の遺伝子。

【請求項7】 (A) t-PAの304位置の塩基性アミノ酸が酸性アミノ酸又は中性アミノ酸により置換されている該t-PA変異体をコードしている遺伝子を含んで成るDNAにより形質転換された宿主細胞を培養し、そして(B) 生ずるt-PA変異体を単離することを特徴とする、t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体を得る方法。

【請求項8】 該t-PA変異体が304位置のア르기ニンがセリンで置換されているt-PA又は304位置のア르기ニンがグルタミン酸で置換されているt-PAである請求項7に記載の方法。

【請求項9】 該t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターがPAI-1、PAI-2及びPAI-3から成る群より選ばれた請求項7に記載の方法。

【請求項10】 (A) t-PAの304位置の塩基性アミノ酸が酸性アミノ酸又は中性アミノ酸により置換されているt-PA変異体を得、そして(B) t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体をスクリーニングする、ことを特徴とする、t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体を提供する方法。

【請求項11】 該t-PA変異体が304位置のア르기ニンがセリンで置換されているt-PA又は304位

置のア르기ニンがグルタミン酸で置換されているt-PAである請求項10に記載の方法。

【請求項12】 該t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターがPAI-1、PAI-2及びPAI-3から成る群より選ばれた請求項10に記載の方法。

【請求項13】 t-PAの304位置の塩基性アミノ酸を産生アミノ酸又は中性アミノ酸で置換することの特徴とする、t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターによる阻害に対して抵抗性のt-PA変異体を得る方法。

【請求項14】 該t-PA変異体が304位置のア르기ニンがセリンで置換されているt-PA又は304位置のア르기ニンがグルタミン酸で置換されているt-PAである請求項13に記載の方法。

【請求項15】 該t-PAのセリンプロテアーゼインヒビターがPAI-1、PAI-2及びPAI-3から成る群より選ばれた請求項13に記載の方法。

【請求項16】 ATCC寄託番号67894を有し且つ304位置のア르기ニンがセリンで置換されているt-PAをコードするpSVT7 (RI) のt-PA (R₃₀₄→S) [DH-1]、又はATCC寄託番号67896を有し且つ304位置のア르기ニンがグルタミン酸で置換されているt-PAをコードするpSVT7 (FI) のt-PA (R₃₀₄→E) [DH-1]。

【請求項17】 304位置のア르기ニンがセリンで置換されているt-PAをコードするプラスミドpSVT7 (RI) のt-PA (R₃₀₄→S)、又は304位置のア르기ニンがグルタミン酸で置換されているt-PAをコードするプラスミドpSVT7 (FI) のt-PA (R₃₀₄→E)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は同起源阻害剤による阻害に対して抵抗性であるキモトリプシン、スーパーファミリ-のセリンプロテアーゼ変異株、及びそれをコードする遺伝子に関する。本発明は又、本発明のセリンプロテアーゼ変異株を阻害するセリンプロテアーゼインヒビター変異株、及びそれをコードする遺伝子に関する。セリンプロテアーゼ変異株、及びセリンプロテアーゼインヒビター変異株は、例えば薬剤として有用である。

【0002】

【従来の技術】 1. セリンプロテアーゼ
セリンプロテアーゼ(E, C, 3, 4, 21)は、サブチル結合分裂における求核試薬としてセリンを使用するエンドペプチダーゼのサブサブクラスである (Barrett, A. J., 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 3-22 頁; 及びHartley, B. S., Ann. Rev.

Biochem., 29:45-72 (1960))。

【0003】セリン・プロテアーゼは文献により周知であり、セリン・プロテアーゼの2つのスーパーファミリー、すなわちキモトリプシン・スーパーファミリー及びストロプティミセフ・スチリジン・スーパーファミリーはこれまでに観察されていた (Barrett, A. J., 著 Proteinase Inhibitors, 出版 Elsevier, Amsterdam, 3-22頁 (1986))；及び James, M. N. G., 著 Proteolysis and Physiological Regulation, 出版 Ribbons, D. W. 等, Academic Press, New York, 125-142頁 (1976))。

【0004】キモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼの例には組織型トラスミン・ゲン活性化因子 (下文では"t-PA")、トリプシン、トリプシン様プロテアーゼ、キモトリプシン、ブラフミン、エラプターゼ、ウロキナーゼ (又は尿型トラスミン・ゲン活性化因子 (下文では"u-PA")、アクトリン、活性化プロテインC、C1エステラーゼ、カニジンG、チマーゼ、ならびにカリクレイン、トリポン及び因子VIIa, IXa, Xa, XIa及びXIIaを含む血液凝固カスケードのプロテアーゼが含まれる (Barrett, A. J., 著 Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 3-22頁 (1986))；Strassburger, W. 等, FEBS Lett., 157:219-223 (1983)；Dayhoff, M. O., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5巻, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland (1972))；及び Rosenthal, R. D. 等, Hosp. Prac., 21:131-137 (1986))。

t-PA, ブラフミン, u-PA, 及び血液凝固カスケードのプロテアーゼを含むキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼのいくつかは巨大分子であり、セリン・プロテアーゼ触媒ドメインの他にその活性の調節に一部関与する構造ドメインを含む (Barrett, A. J., 著 Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 3-22頁 (1986))；Gerard, R. D. 等, Mol. Biol. Med., 3:449-457 (1986))；及び Blasi, F. 等, 著 Human Genes and Diseases, 出版 Blasi, F. 等, John Wiley & Sons, Ltd., 377-414頁 (1986))。

【0005】キモトリプシン・スーパーファミリーのすべてのセリン・プロテアーゼの触媒ドメインは配列相同性、及び構造相同性を両方有する。配列相同性は以下：

(i) 特異的活性化部位残基 (例えばトリプシンの場合 Ser₁₉₅, His₅₇, 及び Asp₁₀₂)；

(ii) オキシアニオン・ホール (例えばトリプシンの場合 Gly₁₉₃, Asp₁₉₄)；及び

(iii) 構造中にβ-スプレッド架橋を形成するシステイン残基の全部の保持を含む (Hartley, B. S., Symp. Soc. Gen. Microbio., 24:152-182 (1974))。

【0006】構造相同性は以下：

(i) 2個のグリーン鍵構造から成る共通折りたたみ (Richardson, J., Adv. Prot. Chem., 34:167-339 (1981))；

(ii) 触媒残基の共通の配置；及び

(iii) 分子のコア中の構造の詳細な保持 (Stroud, R. M., Sci. Am., 231:24-88 (1974))を含む。

【0007】キモトリプシン・スーパーファミリーのメンバーの配列を比較すると触媒ドメイン内のアミノ酸の挿入、又は欠失の存在が明らかになる (例えば図1を参照)。すべての場合、これらの挿入又は欠失は折りたたまれた分子の表面にあり、従って分子の基本的構造に影響しない (Strassburger, W. 等, FEBS Lett., 157:219-223 (1983))。

II. セリン・プロテアーゼ・インヒビター

セリン・プロテアーゼ・インヒビターは文献により周知であり、以下の科 (ファミリー) に分けられる：(i) 塩基性プロテアーゼ・インヒビターとしても知られる牛肝臓トリプシン・インヒビター (Kunitz) ファミリー (Ketcham, L. K. 等, 著 Atlas of Protein Sequence and Structure, 出版 Dayhoff, M. O., 131-143頁 (1978)) (下文では"BP TI")、(ii) Kazalファミリー、(iii) ストリプティミセフ・スチリジン・インヒビターファミリー (下文では"SSI")、(iv) セルビン・ファミリー、(v) 大豆トリプシン・インヒビター (Kunitz) ファミリー、(vi) ナゼリン・インヒビターファミリー、及び(vii) サーマン・ローグ・ファミリー (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49:593-626 (1980))；Read, R. J. 等, 著 Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986))；及び Laskowski, M. 等, Cold Spring Harbor Symp.

Quant. Biol., LII: 545-553 (1987))。

【0008】BPTI, Kazal, SSI, 大豆トリプシン, 及びボテト インヒビターファミリーのメンバーを含む多くの完全な形の阻害剤、及びセルピリン アルブアー1-アンチトリプシン/分裂素に関して結晶学的データが得られる (Read, R. J. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986))。これらのセリン プロテアーゼ インヒビターは大きさ及び配列が膨大なタンパク質であるにもかかわらず、これまでに研究された完全な形のインヒビターはすべて分子の表面から伸びる特徴的なループを共通して有しており、それは同起源のセリン プロテアーゼの活性化部位に対する認識配列を含む (Levin, E. G. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 6804-6808 (1983))。異なるセリン プロテアーゼ インヒビターのループが構造的に類似していることは驚くべきことである (Papamokos, E. 等, J. Mol. Biol., 158: 515-537 (1982))。阻害剤のKazalファミリー及びストレプトミセア/スプテリニンファミリーはいずれも構造及び配列に類似性があるが、一般に異なるファミリーのセリン プロテアーゼ インヒビターは活性化部位ループ以外に構造的関連性はない。

【0009】セリン プロテアーゼ インヒビターの多くは広範囲の特異性を持ち、血液凝固セリン プロテ

アーゼを含むプロテアーゼのキモトリプシン、スーパーファミリ、及びセリン プロテアーゼのストレプトミセア/スプテリニン、スーパーファミリーの両方を阻害することができる (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49: 593-626 (1980))。各阻害剤の特異性はセリン プロテアーゼによる阻害剤の潜在分裂の部位への直接のアミノ末端であるアミノ酸の同定によりまづ決定すると思われる。P₁部位残基として知られるこのアミノ酸はセリン。プロテアーゼの活性部位内のセリンとアシル結合を形成すると思われる (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49: 593-626 (1980))。

【0010】A. BPTIファミリー
BPTIファミリーに属するセリン プロテアーゼ インヒビターには、BPTI、ヘビ毒インヒビター、インターアルブアー インヒビター、及びA4アミロイト前駆体A4695が含まれる (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49: 593-626 (1980); Read, R. J. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986)、及びPonté, P. 等, Nature, 331: 525-527 (1988))。セリン プロテアーゼ、及びそれらと同起源のBPTIファミリー阻害剤の例を下表Iに挙げる。

【0011】

表I

セリン プロテアーゼ トリプシン	同起源BPTI阻害剤 BPTI ヘビ毒インヒビター インターアルブアー インヒビター A4アミロイト前駆体A4695 プロテアーゼ、ネウジニンII
---------------------	--

(未知)

B. Kazalファミリー

Kazalファミリーに属するセリン プロテアーゼ インヒビターには、すい臓分泌阻害剤、オボムコイド、及び精漿アクロシン インヒビターが含まれる (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., 49: 593-626 (1980); Read, R. J. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Else

vier, Amsterdam, 301-336頁 (1986); 及びLaskowski, M. 等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., LII: 545-553 (1987))。セリン プロテアーゼ、及びそれらと同起源のKazalファミリー阻害剤の例を下表IIに挙げる。

【0012】

表II

セリン プロテアーゼ トリプシン	同起源Kazal阻害剤 すい臓分泌阻害剤 オボムコイド 精漿アクロシン インヒビター オボムコイド
アクロシン	精漿アクロシン インヒビター

C. ストレプトミセス・ズブチリシン・インヒビター
 ストレプトミセス・ズブチリシン・インヒビター・ファミ
 ミリーに属するセリン・プロテアーゼ・インヒビターには
 ストレプトミセス・アルブミン・セフェルスから得られる阻
 害剤、及びアラミド・「ストレプト」が含まれる (Las
 kowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem.

m., 49:593-626 (1980))。セリン
 プロテアーゼ及びそれらと同起源のストレプトミセス
 ズブチリシン・クラスの阻害剤の例を下表 I I I に挙げる。

【0013】

表 I I I

セリン・プロテアーゼ	同起源 S S I インヒビター
ズブチリシン・BPN'	ストレプトミセス・アルブミン・セフェルス インヒビター
アラミド	アラミド・ストレプト
「ストレプト」	アラミド・ストレプト

D. セルビン・ファミリー

セルビン・ファミリーに属するセリン・プロテアーゼ
 インヒビターにはプラスミン・「活性化因子」インヒビ
 ター PAI-1, PAI-2 及び PAI-3, C1 エステラーゼ・インヒビター、アルファ-2-アンチトリプ
 シン、コントラプシン、アルファ-1-アンチトリプ
 シン、アンチトロンビン・I I I, プロテアーゼ・ネカ
 シン・I, アルファ-1-アンチキモトリプシン、プロテ
 イン C インヒビター、ヘパリン・補因子・I I, 及び成長
 ホルモン調節タンパク質が含まれる (Carrel, R. W. 等, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 52:527-535 (1987); Sommer, J. 等, Biochem., 26:6407-6410 (1987); Suzuki, K. 等, J. Biol. Chem., 262:6111-6116 (1987))。及び Sump, D.

C. 等, J. Biol. Chem., 261:12759-12766 (1986))。

【0014】セルビンによるセリン・プロテアーゼの阻
 害は Travis, J. 等, Ann. Rev. Biochem., 52:655-709 (1983); Carrel, R. W. 等, Trends Biochem. Sci., 10:20-24 (1985); Sprengers, E. D. 等, Blood, 69:381-387 (1987); 及び Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam (1986) で調査されている。

【0015】セリン・プロテアーゼ、及びそれらと同起
 源のセルビン・インヒビターの例を下表 I V に挙げる。

【0016】

表 I V

セリン・プロテアーゼ	同起源セルビン・インヒビター
活性化プラスミン C	プロテイン C 阻害剤
	PAI-1
C1 エステラーゼ	C1 エステラーゼ・インヒビター
カタレプシン・G	アルファ-1-アンチトリプシン
	アルファ-1-アンチキモトリプシン
チマーゼ	アルファ-1-アンチキモトリプシン
キモトリプシン	アルファ-1-アンチキモトリプシン
	アルファ-2-アンチトリプシン
	コントラプシン
凝固因子 (VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa)	アンチトロンビン・I I I
エラステラーゼ	C1 エステラーゼ・インヒビター
カリクレイン	アルファ-1-アンチトリプシン
	C1 エステラーゼ・インヒビター
プラスミン	アルファ-1-アンチトリプシン
トロンビン	アルファ-2-アンチトリプシン
	アンチトロンビン・I I I
	ヘパリン・補因子・I I
t-PA	PAI-1, PAI-2, PAI-3
トリプシン	アルファ-1-アンチトリプシン

トリプシン様 プロテアーゼ
u-PN

F. 大豆トリプシン-インヒビターファミリー
大豆から精製した大豆トリプシン-インヒビターファミリーの唯一の例は配列が決定されている。牛すい臓トリプシンとのその複合体が研究されている (Sweet, R. M. 等, Biochem., **13**:4214-4228 (1974))。

【0017】F. ポテト-インヒビターファミリー
ホウレンソウ-インヒビターファミリーに属するセリン-プロ

成長ホルモン調節蛋白質
プロテアーゼ-ネクシン-1
PAI-1, PAI-2,
PAI-3

ロテアーゼ-インヒビターには、じゃがいも、大麦、及びひるからの阻害剤が含まれる (Read, R. J. 等, 見: Proteinase Inhibitors, 出版: Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986))。セリン-プロテアーゼ、及びそれらのポテトインヒビターの例を下表Vに挙げる。

【0018】

表V

セリン-プロテアーゼ	ポテト-インヒビター
キモトリプシン	大麦キモトリプシン-インヒビター
スズキリジン-1	大麦キモトリプシン-インヒビター
スズキリジン-2	スズキリジン-2からスベルグ-1

G. ポーマジン-カーブ-インヒビター
ポーマジン-カーブ-インヒビターファミリーに属するセリン-プロテアーゼ-インヒビターはマヌから非同定量的性質を含む (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., **49**:593-626

(1980))。セリン-プロテアーゼ、及びそれらのポーマジン-カーブ-インヒビターの例を下表VIに挙げる。

【0019】

表VI

セリン-プロテアーゼ	ポーマジン-カーブ-インヒビター
トリプシン	あおいま阻害剤-IV
ユラスタターゼ	ダーテンヒン阻害剤
キモトリプシン	アズキマ阻害剤-III

【0020】セリン-プロテアーゼ-インヒビター複合体すべてのファミリーからのセリン-プロテアーゼ-インヒビターはそれらと同源のセリン-プロテアーゼと安定な1:1複合体を形成する。これらの複合体の解離は非常に遅い (数時間から数日) (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., **49**:593-626 (1980))、及びLevin, E. G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**:6804-6808 (1983))。セリン-プロテアーゼを除くすべてのセリン-プロテアーゼ-インヒビターの場合、解離生成物は完全な形で、及び分裂した阻害剤分子の混合物である。他方、セリン-プロテアーゼ-セリン-複合体は解離により分裂した阻害剤分子のみを生ずるようなので、セリンは他のセリン-プロテアーゼ-インヒビターと多岐異なる機構を使用すると思われる。

【0020】トリプシン-BPTI、キモトリプシン-オサムロイト-インヒビター、キモトリプシン-ポテト-インヒビター、及びスズキリジン-スズキリジン-インヒビターを含む数種のセリン-プロテアーゼ-阻害剤複合体に関する構造データが得られる (Read, R. J. 等, 見: Proteinase Inhibitors, 出版: B

arrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 301-336頁 (1986))。これらの構造を調べると、阻害剤の膨大な配列にもかかわらず、各阻害剤とその同源のセリン-プロテアーゼ間の特異的な相互作用において顕著な類似性があることが明らかになる。本発明においてこの構造的類似性により、結晶構造が得られない場合でも阻害剤及びそれと同源のセリン-プロテアーゼの間に起きるアミノ酸相互作用を予測することができるとことを示唆した。

【0021】上記の議論の通り阻害剤は活性中心を含み、それがセリン-プロテアーゼの活性部位に対する枯抗基質となる。活性中心のP₁-P₁'残基 (例えばPAI-1の場合ARG₃₄₆-Met₃₄₇) 間の二重結合への攻撃によりセリン-プロテアーゼからの生成物の正常で迅速な解離が起こらず、おそらくプロテアーゼの活性部位のセリン及び阻害剤のP₁'残基の間の共有結合の形成により安定なセリン-プロテアーゼ-インヒビター複合体が確立される (Laskowski, M. 等, Ann. Rev. Biochem., **49**:593-626 (1980))。この機構は、PAI-1などの阻害剤の活性中心がセリン-プロテアーゼの活性部位に緊密に、正確に適合しなければならないことを示す。しかしこれまでPAI-1、それと同源のセリン-プロテアー

セ、t-PA、又はt-PA/PAI-1複合体についてのX線結晶学的データはない。従ってこのタンパク質の対の間の相互作用の正確な性質は未知である。他のセリン、又はセリン-セリン-プロテアーゼ複合体の構造についての情報も同様には不足している。

1.V. セリン-プロテアーゼの利用

キモトリプシン、スロウファミリーの特に重要なセリン-プロテアーゼはt-PAである。t-PAは直接作用して血栓(血餅)を溶解するわけではない。心筋梗塞、肺塞栓症、及び重症の静脈血栓の治療に、冠動脈内又は静脈内投与によって現在使用されている。t-PAはプラスミン-ゲンのArg₆₆₀及びVal₆₆₁の間のプロテオリ結合の分裂を促進し(Kotlibins, K. C. 等, J. Biol. Chem., **242**:2333-2342 (1967))。それは16%活性なチモゲンに強力であるが非特異的なプロテアーゼ、ブラスミンに変換し、それが血餅のフィブリン網目を分解する(Bachmann, F. 等, Semin. Throm. Hemost., **43**:77-89 (1984)、Gerard, R. D. 等, Mol. Biol. Med., **3**:449-557 (1986)、及びVerstraete, M. 等, Blood, **67**:1529-1541 (1986))。

【0022】t-PAは必ずしも全身的にフィブリン-ゲンを枯渇させることなく局所的なフィブリン溶解現象を起こす。これはt-PAがフィブリンに直接結合しフィブリン-t-PA複合体を形成することができ、そのプラスミン-ゲンに対する親和力が約500倍に増加するからである(Ranby, M. 等, Biochem. Biophys. Acta, **704**:461-469 (1982)、及びRijken, D. C. 等, J. Biol. Chem., **257**:2920-2925 (1982))。このようにプラスミン-ゲンも高濃度で存在する(Wiman, B. 等, Nature, **272**:549-550 (1978))。冠動脈血栓に、静脈内投与されたt-PAが結合すると血栓の部位でプラスミンが有効に製造され、そこで最高に働く。

【0023】現在、t-PAは最初にボラムの形態で投与され、その後一定の注人を続ける。3時間の標準の治療の間に投与される酵素の合計量は一般に約50-100mgである。この理由でこのような大量を必要とすることが明白である。第1に、肝細胞による循環からの急速なt-PAのクリアランスの効果を補うため(Krause, J., Fibrinolysis, **2**:133-142 (1988))、及び第2に、血漿及び血小板中に存在する比較的高濃度のセリン-プロテアーゼ-インヒビターの影響を克服するため(Carrell, R. W. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 頁403-42

0 (1986))。

【0024】t-PAの主な生理学的阻害剤はセリン-PAI-1、約50kdの糖タンパク質である(Pannekoek, H. 等, EMBO J., **5**:2539-2544 (1986)、Ginsberg, D. 等, J. Clin. Invest., **78**:1673-1680 (1986)、及びCarrell, R. W. 等, 於: Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 頁403-420 (1986))。PAI-1は心筋内梗塞から生き残った人からの血漿のフィブリン溶解現象の能力が減少している原因とされてきた(Hamsten, A. 等, New Eng. J. Med., **313**:1557-1563 (1985))、さらにPAI-1は急性期反応性タンパク質であり、心筋梗塞に伴いその量が増加することにより、治療のためのt-PAの注入後に血漿中に残った実質的量のt-PAのフィブリン溶解現象活性を減衰させる(Lucore, C. L. 等, Circ., **77**:660-669 (1988))。PAI-1とt-PAの結合の2次速度定数は非常に高い(Hekman, C. 等, Arch. Biochem. Biophys., **262**:199-210 (1988))、人の血漿によるt-PAの最初の"急速相(fast-phase)"阻害を説明している(Colucci, M. 等, J. Lab. Clin. Med., **108**:53-59 (1986))。従ってインヒビタにおけるPAI-1によるt-PAの急速な中和は、急性心筋梗塞の治療をした10%から35%の患者が冒される合併症である、血栓溶解治療後の冠動脈ステントに寄与する(Chesebro, J. H. 等, Circ., **76**:142-154 (1987))。

【0025】C1エステラーゼ-インヒビター、及びアルファ₂-アンチブラスミンなどの他のセリンとt-PAの結合定数はPAI-1の場合より低次数である(Ranby, M. 等, Throm. Res., **27**:175-183 (1982)、及びHekman, C. 等, Arch. Biochem. Biophys., **262**:199-210 (1988))、それにもかかわらずこれらのセリンは注入されたt-PAと結合し、t-PAの有利な薬理学的性質を減衰させることができる。

【0026】t-PA及びPAI-1の他に多くのセリン-プロテアーゼ-セリンの対が医学的に非常に重要である。例えばu-PAはt-PAと同様に心筋梗塞の治療に有用であり、t-PAと同様のセリン-プロテアーゼ-インヒビターによる阻害を受ける。

【0027】傷における血餅形成の促進に局所的に使用されるセリン-プロテアーゼであるトロンビンはプロ凝固剤である。それと同起源のセリンである、アンチト

ロニン 111 は、トロンビン、及び因子 I Xa、Xa、XIa 及び XIla を含む血液凝固カスケードに關与する多くのセリン・プロテアーゼを特異的に阻害する凝固防止剤である (Heimburger, N. 等, 於 Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, 出版 Fritz, H. 等, Walter de Gruyter, New York, 頁 1-22 (1971); Kurachi, K. 等, Biochem., 15: 373-377 (1976); Kurachi, K. 等, Biochem., 16: 5831-5839 (1977); 及び Osterud, B. 等, Semin. Thromb. Haemost., 35: 295-305 (1976))。アンチトロンビン 111 は播種性血管内血液凝固の治療に使用されてきた。トロンビンによりプロテイン C を活性化すると、活性化プロテイン C が凝固因子 Va 及び VIIa を不活性化し、それ自身はそれと同起源のセリン・プロテアーゼ・インヒビターにより阻害されるので血液凝固過程の自己制限が起こる。

【0028】子宮収縮を起こす、血管の浸透性を増す、及び血液凝固の内部経路を起こす機能を持つカリクレインは、比較的重要なセリンのひとつであるアルファ₁-アンチトリプシンにより阻害を受ける。

【0029】アルファ₁-アンチトリプシンはトリプシンと同様に白血球エラスターゼ、及びカテプシンも阻害する (Heimburger, N. 等, 於 Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, 出版 Fritz, H. 等, Walter de Gruyter, New York, 頁 1-47 (1971); Janoff, A., Am. Rev. Resp. Dis., 105: 121-127 (1972); 及び Ohlsson, K. 等, Eur. J. Biochem., 36: 473-481 (1973))。アルファ₁-アンチトリプシンの遺伝子欠失は直接気腫に關連し (Carrelli, R. W. 等, Trends

【0030】Biochem. Sci., 10: 20-24 (1985))。従ってアルファ₁-アンチトリプシン置換が気腫の治療に使用されてきた (Marx, J. L., Science, 243: 315-316 (1989))。

【0031】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、キモトリプシン・スーパーファミリーの野生型セリン・プロテアーゼ、特に野生型 t-PA をタンパク質工学により改良し、必ずしも他の有利な薬理学的性質を変えることなくその酵素有効性を増し、及び/又は必要な

投与量を変えることである。

【0032】本発明のもうひとつの目的は、キモトリプシン・スーパーファミリーの改良セリン・プロテアーゼをコードする遺伝子を提供することである。

【0033】本発明のさらに別の目的は、特にセリン・プロテアーゼの野生型セリン・プロテアーゼ・インヒビター、特に野生型 PAI-1 を変え、それらの阻害有効性を増し、及び/又はその投与必要量を変え、本発明の変異セリン・プロテアーゼを阻害することができるようにすることである。

【0034】本発明のさらに別の目的は、改良セリン・プロテアーゼ・インヒビターをコードする遺伝子を提供することである。

【0035】本発明のこれらの、及び他の目的は、同起源の阻害剤による阻害に対して抵抗性であるキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ、変異株、及びそれをコードする遺伝子、ならびにセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害するセリン・プロテアーゼ・インヒビター変異株、及びそれをコードする遺伝子により満たされ、これは本文に示す本発明の詳細な説明により明らかとなるであろう。

【0036】

【課題を解決するための手段】上記で議論した通り、本発明の上記の目的は、それらと同起源の阻害剤による阻害にたいして抵抗性を持つキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ変異株、及びそれをコードする遺伝子を用いたひとつの具体化により達成することができる。

【0037】本発明のもうひとつの具体化において、本発明のセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害するセリン・プロテアーゼ・インヒビター変異株、及びそれをコードする遺伝子により上記の目的を達成した。

【0038】さらに別の具体化において、本発明のセリン・プロテアーゼ・インヒビター変異株はキモトリプシン・スーパーファミリーの野生型セリン・プロテアーゼをも阻害する。

【0039】エ、トリプチナーゼのこのセリン・プロテアーゼ・スーパーファミリーのメンバーはすべて相同タンパク質であり、共通の作用機構を有するので、本発明において使用するキモトリプシン・スーパーファミリーの特定のセリン・プロテアーゼはここで重要ではない。そのようなキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼの特別な例には上記で上げたセリン・プロテアーゼ、すなわち t-PA、トリプシン、トリプシン様プロテアーゼ、キモトリプシン、プラスミン、エラスターゼ、u-PA、アルボリン、活性化プロテイン C、C1 エステラーゼ、カテプシン G、チマーゼ、及びカリクレイン、トロンビン、及び因子 VIIa、IX

a, Xa, XIa, ならびにXIIaを含む血凝固カスケードのプロテアーゼが含まれる。本発明において使用した好ましいキモトリプシンスーパーファミリーのセリン・プロテアーゼはt-PAである。

【0040】キモトリプシンスーパーファミリーを変異セリン・プロテアーゼが阻害しないして抵抗性を示す特定のセリン・プロテアーゼ・インヒビターは本発明において重要ではない。そのようなインヒビターの例にはBPT1ファミリー、Kazal1ファミリー、SSIファミリー、セルピジンファミリー、カズールプシン・インヒビター(Kunitz)ファミリー、ザネド・インヒビターファミリー、及びガーマシー・カーク・ファミリーのメンバーが含まれる。

【0041】キモトリプシンスーパーファミリーの変異セリン・プロテアーゼが阻害に対して抵抗性を示す特定のBPT1インヒビターは本発明において重要ではない。そのようなBPT1インヒビターの例にはBPT1、トキエンヒビター、インターアルブミンヒビター、及びA4アミロイド前駆体A4695が含まれる。

【0042】キモトリプシンスーパーファミリーの変異セリン・プロテアーゼが阻害に対して抵抗性を示す特定のKazal1インヒビターは本発明において重要ではない。そのようなKazal1インヒビターの例にはすい臓分泌インヒビター、カボムコイト、及び精漿アクトリン・インヒビターが含まれる。

【0043】キモトリプシンスーパーファミリーの変異セリン・プロテアーゼが阻害に対して抵抗性を示す特定のセリン・インヒビターは本発明において重要ではない。そのようなセリン・インヒビターの例にはPAI-1, PAI-2, PAI-3, C1エステラーゼ・インヒビター(C1inh), プロテインC・インヒビター(PCinh), インスリン・補因子-11(HC11), アルファ₂-アンチプラズミン(A₂AP), アンチトロンビン-111(AT111), アルファ₁-アンチトリプシン(A1AT), プロテアーゼ・ネクスト-1(Nex-1), コントラプシン(Cntrps), 成長ホルモン調節タンパク質(GHRP), 及びアルファ₁-アンチキモトリプシン(AChym)が含まれる。キモトリプシンファミリーのセリン・プロテアーゼが阻害に対して抵抗性を示す好ましいセナヒンはPAI-1である。

【0044】本発明のキモトリプシンスーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害することができる変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターをそれらから誘導することができる特定のセリン・プロテアーゼ・インヒビターは、本発明において重要ではない。そのようなセリン・プロテアーゼ・インヒビターの例にはBPT1, Kazal1, SSI, Kunitz, ザネド・インヒビター、ボ

ーマン・パーカ・インヒビター、及びセルピジンファミリーのメンバーが含まれ、PAI-1, PAI-2, PAI-3, C1エステラーゼ・インヒビター, プロテインC・インヒビター, インスリン・補因子-11, アルファ₂-アンチトリプシン, アンチトロンビン-111, アルファ₁-アンチトリプシン, プロテアーゼ・ネクスト-1, コントラプシン, 成長ホルモン調節タンパク質、及びアルファ₁-アンチキモトリプシンなどのセナヒン・ファミリー・セリン・プロテアーゼ・インヒビターが好ましい。キモトリプシンスーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害する好ましい変異セリンはPAI-1である。

【0045】すべての周知のセリン・プロテアーゼ・インヒビターはその活性中心部位において構造的に相同であり、それらと同源のセリン・プロテアーゼと類似の相互作用を行う(Read, R. J. 等, Proteinase Inhibitors, 出版 Barrett, A. J. 等, Elsevier, Amsterdam, 頁301-336 (1986))。セリン・プロテアーゼ、及びセリン・プロテアーゼ・インヒビターとの間の構造における対応はこれまでに研究されたことのない複合体のモデルの構築に利用することができる。

【0046】t-PA、及び他のセリン・プロテアーゼの触媒・メインの間の構造的相同性が高いので(Blundell, T. 等, Nature, 326, 347-352 (1987))、本発明においてトリプシン、及びBPT1間の複合体の周知の構造(Hubert, R. 等, J. Mol. Biol., 89, 73-101 (1974))、及びBode, W. 等, Proteolysis and Physiological Regulation, Academic Press, New York, 頁43-76 (1976))からt-PA及びPAI-1の間の相互作用のモデルとなり得ると仮定した。主な認識部位のアミノ酸以外にBPT1と直接接触するトリプシンのアミノ酸はポリペプチド鎖の2つの別の領域に位置する(残基37-41、及び210-213)。(図1参照)。

【0047】アミノ酸残基₂₁₄SWG₂₁₅の周囲の領域はキモトリプシンスーパーファミリーのすべてのメンバーが高度に保持されている。反対にアミノ酸残基₃₆NSGYHF₄₁の周囲の領域は比較的变化し易く、インヒビターと相互作用を行う表面の部分形成する。図1に示される通りこの領域のt-PAのアミノ酸配列は2つの大きな点でトリプシンのアミノ酸配列と異なる。第1にトリプシンのTyr₃₀₄残基がt-PAにおいてはArg_(R₃₀₄)で置換されている。t-PA及びPAI-1の間の相互作用がトリプシン及びBPT1の間の相互作用を模倣しているという仮定に基づき、モデルはt-PAのR₃₀₄がPAI-1のGlu

(E₃₅₀) 残基と塩橋を形成することを示唆する。この PAI-1 の Glu 残基の位置は、トリプシンの Y₃₉ とファンデルワールス結合を形成する BPTI の I₁₉ に対応する (下表 VII) (Huber, R. 等, J. Mol. Biol., 89: 73-101 (1974)); 及び Bode, W. 等, Enzyme Proteolysis

and Physiological Regulation, Academic Press, New York, 頁 43-76 (1976))。従って PAI-1 の E₃₅₀ は t-PA の R₃₀₄ とイオン対を形成すると思われる。

【0048】

表 VII

	P1	P4'
12	•	•
24		
BPTI	GPCKATIIIRYFYN	
343	•	•
355		
PAI-1	VSARMAPEEIIIMD	
557	•	•
569		
PLG	CPGRVVGCVAMP	

第2に t-PA は、t-PA (R₃₀₄) 及び PAI-1 (E₃₅₀) の間の接点と思われる位置に隣接して位置する十分な7個のアミノ酸 (E₂₉₆, KHRRSPG₃₀₂, 図1を参照) を有する。これらの7個のアミノ酸の中の4個は正に帯電しており、PAI-1 (E₃₅₀EEIIMD_{neg}) の相補的領域と思われる領域は3個の負に帯電した残基を含む。本発明においては、これらの領域間の静電的相互作用が t-PA 及び PAI-1 の間の複合体の形成、及び安定化に重要な役割を果たし得ると思われる。逆に t-PA がその基質である、同領域に負に帯電した残基を持たないプラスミノゲン (PLG) と相互作用を行う場合はこのような相互作用が起こり得ない (上記表 VII を参照)。

【0049】図1に示すようなキモトリプシン・スーパーファミリーの種々のセリン・プロテアーゼの配列の比較は、キモトリプシン・スーパーファミリーの種々のセリン・プロテアーゼの1種類又はそれ以上の変異を設計してそれらと同系統の野生型阻害剤による阻害に対して抵抗性とするための指針として使用することができる。t-PA と同様に図1に示すキモトリプシン・スーパーファミリーの他のセリン・プロテアーゼは、重要な結合残基 (トリプシンの Y₃₉)、及び結合残基に隣接して位置する種々の大きさの挿入残基を含む点でトリプシンと異なる。従って変異の候補の例には以下が含まれる。

(1) 他のセリン・プロテアーゼにおいてトリプシンの Tyr (Y₃₉) (BPTI の Ile (I₁₉)) と結合し、従って2個のタンパク質間の相互作用において重要な役割を果たす残基の位置に対応する位置を占めるアミノ酸残基。例えばプラスミンにおいて、Met (M) 残基はトリプシンの Y₃₉ に対応する位置を占める。この Met 残基を電荷、又は大きさなどの性質の異なる他のアミノ酸 (例えば Glu (E)) に変異させると、プラスミンのアンチプラスミンによる不活性化に対する感受性がなくなるか、又は減少することが期待されるが、使用する特定の置換アミノ酸は本発明において重要でない。同

様にトリプシンの Glu (Q) 残基 (トリプシンの Y₃₉ に対応する位置を占める) を電荷、又は大きさなどの性質が異なる別のアミノ酸 (例えば Asp (D)) に変異させると、トリプシンのアンチトリプシン I II による不活性化に対する感受性がなくなる、又は減少することが期待されるが、使用する特定の置換アミノ酸は本発明において重要でない。及び

(11) トリプシンには存在せず、分子の表面の小さい挿入として活性部位の近辺に位置するキモトリプシン・スーパーファミリーの他のセリン・プロテアーゼの残基 (図1を参照)。例えばプラスミンは結合残基に隣接して t-PA の E₂₉₆, KHRRSPG₃₀₂ により占められている位置に対応する位置に、2個のアミノ酸 (KF) の挿入を含む。これらの2個のアミノ酸のどちらか、又は両方の欠失、又は置換、あるいは少量の別のアミノ酸の挿入による変異により、必ずしもセリン・プロテアーゼの触媒部位に影響することなく阻害剤との相互作用を失わせる、又は減少させることが期待される。もうひとつの例として、t-PA は結合残基に隣接して t-PA の E₂₉₆, KHRRSPG₃₀₂ により占められている位置に対応する位置に6個のアミノ酸 (RHRRGGSS) の挿入を含む。これらの6個の残基の変異、又は欠失は変異 t-PA (De: E₂₉₆₋₃₀₂) の場合に観察される相互作用と類似の方法によるセリン・プロテアーゼ・インヒビターとの相互作用が減少する、又はなくなることを期待される。

【0050】同様に、セリン・プロテアーゼ・インヒビターの活性中心内の領域は非常に変化し易く、セリン・プロテアーゼと相互作用を行う表面の部分形成する。図2〜3に示すようなセキピン・ファミリーの種々のセリン・プロテアーゼ・インヒビターの配列の比較は種々のセリン・プロテアーゼ・インヒビターにおいて、特にセリン・プロテアーゼ・インヒビターのセキピン・ファミリーのメンバーに、本発明のキモトリプシン・スーパーファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター

抵抗性セリン・プロテアーゼを有効に阻害することができるような1種類がそれ以上の変異を起す設計の指針として利用することができる。PAI-1と同様に図2～3に示した他のセルリン・ファミリーのメンバーは、

重要な結合アミノ酸残基 (PAI-1のE₃₅₀) における配列が異なり、結合残基に隣接した位置に種々の大きさの挿入を含む (下表V111を参照)。

【0051】

表V111

セルリン	344	P1-P1'	358
h PAI-1	SA	RMAPEE-----IIMDRPF	
r PAT-1	SA	RMAPTE-----MVLDRSF	
h PAI-2	IG	RTGHGG---PQFVADHFP	
h A1AT	IP	MSIPPE-----VKFNKPF	
b A1AT	IP	MSIPPE-----VKFNKPF	
m A1AT	VP	YSMPPI-----LRFDHFP	
r GHRP	L	KSLPQTI---PLLNFNKPF	
h Achyr	TL	LSALVETRTI-VRFNRPF	
m Cntrps	G	IRKAILPA-----VHFNRPF	
h AT111	AG	KSLNPN---RVTFKANKPF	
h HCI1	MP	LSTQVR-----FTVDEPF	
h A2AP	S	KMSLSS-----FSVNRPF	
h C1nh	AA	EFLLV-----FEVQQPF	
h PC1h	TF	RSARLN---SQRLVFNRPF	
r Nex-1	A	ESSPPW-----FIVDFPF	

(h=ヒト; r=ラット; b=ヒビ; およびm=マウス)

従って変異の候補の例には10が含まれる:

(i) 他のセリン・プロテアーゼ・インヒビターにおいて、PAI-1のGlu (E₃₅₀) (t-PAのArg (R₃₀₄)) と結合し、従って2個のタンパク質の相互作用において重要な役割を果たす残基の位置に対応する位置 (P4') を占めるアミノ酸残基。本発明においては、t-PAにおけるR₃₀₄→E変異の構築によりこゝれた静電的相互作用を復活させるためにPAI-1 (E₃₅₀) のGlu残基をArg (R) に変異させた。このセルリンにおける特異的な変異は、セリン・プロテアーゼに導入され野生型セルリンによる阻害に対する抵抗性を与えた変異と相補的であるように構築された。セルリンにおけるこの相補的E₃₅₀→R変異はセルリンに本発明のキモトリプシンファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼを阻害する能力を与えるために特別に選んだ。しかし使用した特定の置換アミノ酸は本発明に対して重要ではない。例えばトリプシンのY₄₀に対応するプラスミンのMet (M) 残基 (図1を参照) を電荷又は大きさなどの性質の異なる別のアミノ酸 (上記の例のようにGlu (E)) に変え、変異プラスミンが野生型アルファ₂-アンチプラスミンによる阻害に対する感受性の減少を示した場合、アルファ₂-アンチプラスミンのP4' Ser (S) 残基を、プラスミンにおいて代わったGlu残基と相互作用のできる他のアミノ酸 (例えばArg (R)) に変異させると、変異アルファ₂-アンチプラスミンによる不活性化に対する変異プラスミンの感受

性が復活することが期待される。同様にトリプシンの変異に関する上記の例のようにトリプシンのGln (Q) 残基Asp (D) に変えた場合、アンチトリプシン I I IのP6' Arg (R) 残基をGlu (E) に変異させると変異アンチトリプシン I I Iによる阻害に対する野生型インヒビター抵抗性トリプシンの感受性が復活することが期待される。

(ii) 同種のセリン・プロテアーゼとの相互作用表面を形成する、種々のファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビターの他のメンバーの活性中心内の余分な残基。セリン・プロテアーゼ・インヒビターのセルリンファミリーに関してこれらの残基を上記の表V111に示す。

例えばアルファ₂-アンチプラスミンは活性中心のPAI-1の₃₄₄APEEIIMD₃₅₅に対応する位置に配列SLSSFSVNを含む。これらの8個のアミノ酸のいずれかの置換により、又は少量の別のアミノ酸の挿入により変異を起こすと、これらの置換又は挿入が電荷、大きさ、あるいは疎水性などの性質において、セリン・プロテアーゼに導入されて最初に野生型セルリンに対する抵抗性を与えたアミノ酸残基と相補的であればセリン・プロテアーゼとの相互作用を復活することが期待される。

【0052】本発明の変異セリン・プロテアーゼ、及び変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターは、例えばオリゴヌクレオチド-媒介突然変異誘発などの周知の方法により製造することができる (Zoller, M. 等、

DNA, 3:479-488 (1984); Kunkel, T. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488-492 (1985), 及び Kunkel, T. 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates & Wiley-Interscience, New York (1987)）。しかしセリン・プロテアーゼ、又はセリン・プロテアーゼ・インヒビターに変異を起こす正確な方法は本発明にとって重要ではない。

【0053】本発明の変異セリン・プロテアーゼは、Lottenberg, R. 等, *Methods Enzymol.*, 80:341-361 (1981)に記載の方法などの周知のアッセイを用いて所望の性質、すなわちセリン・プロテアーゼ活性、及び同起源の阻害剤による阻害に対する抵抗性を持つセリン・プロテアーゼに関してスクリーニングを行うことができる。

【0054】本発明の変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターは、Lottenberg, R. 等, *Methods Enzymol.*, 80:341-361 (1981); Holmes, W. E. 等, *Biochem.*, 26:5133-5140 (1987), 及び Hekman, C. M. 等, *Arch. Biochem. Biophys.*, 262:199-210 (1988)に記載の方法などの周知のアッセイを用いて所望の性質、すなわち本発明のセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼに対するセリン・プロテアーゼ・インヒビター活性を有するセリン・プロテアーゼ・インヒビターに関してスクリーニングを行うことができる。

【0055】本文に記載する研究は、セリン・プロテアーゼを突然変異誘発により修正し、キモトリプシン・スーパージファミリーのセリン・プロテアーゼ、及びそれと同起源の阻害剤の間の相互作用を減少させる、又はなくすことが可能であることを初めて示すものである。これにより変異セリン・プロテアーゼは同起源の阻害剤の存在下で野生型の酵素より酵素活性が多く残り、残留活性の量はそれと同起源の阻害剤との相互作用が阻害される程度に依存している。そのような変異セリン・プロテアーゼの投与は多種類の臨床的、及び商業的用途において有益であると思われる。例えば活性化プロスタグリン₂の変異型は、血液の凝固を阻害する方が有利である場合有用であると思われる。本文の実施例1に記載の α -P Aの変異型が、フィブリン溶解現象を延長する必要がある場合に血栓性異常のある患者の循環における α -P Aの有効寿命を延ばすのに有用であると思われるのとちょうど同じである。

【0056】本文に記載した研究は又、セリン・プロテアーゼ・インヒビターを突然変異誘発により修正し、セリン・プロテアーゼ・インヒビターの構造を適切に変化

させることにより、キモトリプシン・スーパージファミリーのセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性変異セリン・プロテアーゼ、及びそれと同起源のセリン・プロテアーゼ・インヒビター間の相互作用を機能的に復活させることが可能であることを初めて示すものである。これにより同起源の野生型セリン・プロテアーゼ・インヒビターが存在する場合より急速に変異セリン・プロテアーゼを不活性化することができ、阻害の速度は変異セリン・プロテアーゼとの相互作用が復活した程度に依存する。このような変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターの投与は、多種の臨床的及び商業的用途においてセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼの活性を制限するのには有益であると思われる。例えばプロスタグリン₂・インヒビターの変異型は、活性化プロスタグリン₂の変異型の存在下で血液の凝固を促進するのが有利であるような場合に有用であると思われる。同様にP A1-1の変異型は、侵襲的な方法が必要な場合には、血栓性異常の治療をした患者の循環においてセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性 α -P A、例えば α -P A (R₃₀₄→E)の有効寿命を短縮するのに有用であると思われる。従ってこのような変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターはセリン・プロテアーゼ・インヒビター抵抗性セリン・プロテアーゼの解毒薬として使用することができる。

【0057】臨床的用途において投与すべき本発明の変異セリン・プロテアーゼの量は使用する特定の変異セリン・プロテアーゼ、所望するセリン・プロテアーゼの治療効果、及び性別、年齢、体重、ならびにプロテアーゼを投与する患者の生理学的条件などの因子に依存するであろう。変異セリン・プロテアーゼの使用量は日常の実験により決定することができる。臨床的用途において投与すべき本発明の変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターの量は使用する特定の変異セリン・プロテアーゼ・インヒビター、所望するセリン・プロテアーゼ・インヒビターの治療効果、及び性別、年齢、体重、ならびにセリン・プロテアーゼ・インヒビターを投与する患者の生理学的条件などの因子に依存するであろう。変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターの使用量は日常の実験により決定することができる。

【0058】本発明の変異 α -P Aは適したインビトロ、及びインビボ・モデルにおける試験、ならびに臨床試験により決定した通りに投与しなければならない。必要な投与量は野生型 α -P Aの場合の必要量の10-1000分の1となるであろうと思われる。

【0059】本発明の変異P A1-1も適したインビトロ、及びインビボ・モデルにおける試験、ならびに臨床試験により決定した通りに投与しなければならない。必要な投与量は変異 α -P Aの場合に必要な量と大体同じであると思われる。

【0060】本発明の変異セリン・プロテアーゼは文獻

により周知のいずれの製薬上許容できるキャリアー、又は希釈剤、例えば生理食塩溶液と併にでも投与することができる (Lucore, C. L. 等, Circ., **77**:660-669 (1988) ; 及び Chesbro, J. H. 等, Circ., **76**:142-154 (1987))。

【0061】本発明の変異セリン・プロテアーゼの特定の投与形態はその特定の用途に依存する。そのような投与形態の例には、静脈内又は腹腔内注射、冠動脈内注入、局所的適用、及びエアロゾル吸入が含まれる。

【0062】本発明の変異セリン・プロテアーゼ・インヒビターの特定の投与形態はその特定の用途に依存する。そのような投与形態の例には、静脈内又は腹腔内注射、冠動脈内注入、局所的適用、及びエアロゾル吸入が含まれる。

【0063】以下の実施例は説明のみを目的としており、本発明の範囲をどのようにも制限するものではない。

【0064】

【実施例】実施例1

t-PA変異株

本実施例に記載する方法はセリン・プロテアーゼとしてt-PAを使用し、同起源のセリン・プロテアーゼ・インヒビターとしてPAI-1を使用する場合を対象とするが、上記のようなキモトリプシン・スーパーファミリーの他のセリン・プロテアーゼ、及び上記のようなそれと同起源の阻害剤も本発明の精神と範囲から逸脱することなく本文に記載の方法により容易に使用することができる。

【0065】A. 突然変異誘発のためのt-PA部位の選択

t-PAの残基Arg₃₀₄及び(296, KHKRSPG₃₀₂)がPAI-1と相互作用をするという仮定を試験するため、オリゴヌクレオチド・媒介突然変異誘発を用いて下表IXに示すt-PAの3種類の変異型を製造した。

【0066】

表IX

野生型t-PA

FAKHRRSPGERFLC

t-PA (Arg₃₀₄→S)

FAKHRRSPGESFLC

t-PA (Arg₃₀₄→E)

FAKHRRSPGEEFLC

t-PA (De1296-302)

FA.....ERFLC

変異t-PA (De1296-302) は上記で議論した、トリプシンには存在しない7個のアミノ酸挿入を含まず、同起源のセリン・プロテアーゼ・インヒビター、PAI-1と相互作用する部分のt-PA配列を完全に除去して構築した。変異株t-PA (R₃₀₄→S) 及びt-PA (R₃₀₄→E) はArg₃₀₄がそれぞれSer 及び Gly に置換されており、正に帯電したArg 残基を選択的に変え、それと同起源のセリン・プロテアーゼ・インヒビター、PAI-1との相互作用を除去するように選んだ。R₃₀₄に対して、電荷対相互作用の欠落のために同起源のセリン・プロテアーゼ・インヒビターに対する感受性の減少したt-PAを与える種々の他の置換を行うことができる。例えばループ中の正に帯電した残基 (残基296-302) を負に帯電した、又は中性のアミノ酸に変える点変異は、t-PA及びPAI-1の間の相互作用を巧びる、減少させる、又は不安定化すると予測される。P₃₀₁をGly (G) 以外の他のアミノ酸で置換することにより類似の結果を得ることができる。さらに残基304と305の間、又は残基296と305の間のとこかに、PAI-1と残基と全く相互作用しない約1-6個のアミノ酸の系列を挿入するように挿入変異を行うことができる。異なる置換、及び、又は置換、挿入及び欠失の組み合わせは、t-PAとPAI-1の相互作用に異なる程度で影響し、それによって特定

の用途、又は臨床的条件に適する性質を持った種々のt-PAを製造することができるであろう。

【0067】B. t-PAのオリゴヌクレオチド・媒介突然変異誘発

t-PAのオリゴヌクレオチド・媒介突然変異誘発は基本的にZoller, M. 等, DNA, **3**:479-488 (1984) の記載に従い、Kunkel, T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**:488-492 (1985) ; 及びKunkel, T. 等, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates & Wiley Interscience, New York (1987) による修正により行った。

【0068】第1に、ヒトのt-PA全長をコードするcDNAを7ローニングした複写を含むプラスミドpSVT7 (RI7) へt-PAを、Sambrook, J. 等, Mol. Biol. Med., **3**:459-481 (1986) に従って用意した。pSVT7 (RI7) へt-PAはpSVT7の誘導体である (Bird, P. M. 等, J. Cell Biol., **105**:2905-2914 (1987)) (図4を参照)。

【0069】pSVT7はpKC3から構築した。pKC3は、Ava I 部位からEco R I 部位までのpBR

322-誘導配列（これは複製の源、及びポリラクタマーゼ遺伝子を含む）がpUC-8 (Messing, J., *Meth. Enzymol.*, 101:20-78 (1983)) の配列に置換されているpko (Van Doren, K. 等, *J. Virol.*, 59:606-614 (1984)) の誘導体である。さらに独特のHindIII部位にポリリンカーが挿入されており、SV40オリジンのPvuII部位上流からIaI部位に変換されている。プロモーターpSVT7はポリテリオフェージT7 RNAポリメラーゼ特異性プロモーターを含む20塩基の塩基対フラグメント (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) をpKC3の独特のStuI部位に挿入することによって得た。このStuI部位はSV40の初期領域から誘導した配列内のSV40配列のヌクレオチド5190の位置（初期転写の開始点から下流約30塩基対にある (Toozé, J. 等, *DNA Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Press, 1813 (1981))）。

【0070】その後EcoRIを用いてpSVT7のクローニングフラグメントを用いてpSVT7の3'末端を満すことにより単一のEcoRI部位をpSVT7から除去した。得られた発現ベクターをpSVT7 (R17) と称する（図4を参照）。

【0071】次に野生型t-PAをコードするcDNAをプラスミドpL611から切り出し (Sambrook, J. 等, *Mol. Biol. Med.*, 3:459-481 (1986); Genetics Institute, Boston, MAから提供)、pSVT7 (R17) に挿入した。pL611はt-PAのAUG開始コドンから5'上流にNcoI及びBamHIの切断部位を導入する合成オリゴヌクレオチドを含む。t-PA cDNAの3'非翻訳配列内のTGA終結コードの下流約280塩基対の位置にBclI部位がある。プラスミドpL611から切り出したt-PA cDNAの約1965塩基対NcoI-BclIフラグメントにXbaIリンカーを加えた。このBclI-BclIフラグメントは完全なt-PAタンパク質をコードする配列を含むが、(i) t-PA mRNAの末端3'非翻訳領域、及び(ii) t-PA mRNAの5'非翻訳領域全体、すなわちSalI部位及びATG開始コードの間の配列に対応する配列が欠けている (Pennica, D. 等, *Nature*, 301:214-221 (1983))。各末端にXbaI部位を持つt-PA cDNAのフラグメント (Sambrook, J. 等, *Mol. Biol. Med.*, 3:459-481 (1986)) をpSVT7でt-PAの製造に使用し

た（図4を参照）。得られたプラスミドからXbaIを用いた消化、0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動による精製により約1970塩基対DNAフラグメントを切り出し、t-PAのN'末端をコードする配列がポリテリオフェージT7及びSV40初期プロモーターの下流におかれるようにしてプラスミドpSVT7 (R17) のXbaI部位に挿入した。得られたプラスミドをpSVT7 (R17) /t-PAと称した（図4を参照）。

【0072】その後pSVT7 (R17) /t-PAをEcoRIを用いて完全に消化した。t-PAの472塩基対フラグメント（アミノ酸206-364を含む領域）をコードするヌクレオチド842-1314を1.2% (w/v) アガロースゲル電気泳動により精製した。このフラグメントを、前以てEcoRIで消化した、牛胎元細胞ホスファターゼを用いて脱オホリル化したポリテリオフェージM13ベクターM13mp18 (Yanish-Perron, C. 等, *Gene*, 33:103-119 (1985)) の複製型DNAと連結した（図4を参照）。

【0073】他に特定しない場合は本文に記載するこれらの及び他の標準的組み替えDNA法は(i) Maniatis, F. 等, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 第1版, Cold Spring Harbor (1982), 及び(ii) *Meth. Enzymol.*, 152巻, 出版Berger, S. 等, Academic Press, New York (1987)に記載の要領で行った。

【0074】連結DNAをEcoRI株TG-1 (Gibson, F., Thesis, University of Cambridge, England (1984)) によってトランスフェクションした。組み替えポリテリオフェージにより形成された白いプラークを採取し、適切な472塩基対EcoRIフラグメントの存在を制限ランニング、サザンハイブリッド形成、及びDNA配列決定により確認した。

【0075】Kunkel, T. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488-492 (1985), 及びKunkel, T., *Meth. Enzymol.*, 154:367-382 (1987)の記載に従い、5'-オホリル化合成突然変異誘発プライマーを用いて472塩基対EcoRIフラグメントにおける変異を導入した。t-PA変異株の構築に使用した3種類の突然変異誘発プライマーの配列は以下である。

5' t-PA (R304→S) GCCCGGAGAGTGGTTCTTGTTCG 3'

	5'	3'
t-PA (R ₃₀₄ -E)	GCCCCGAGAGGAGTTCCCTTGC	
	5'	3'
t-PA (Del ₂₉₆₋₃₀₂)	GCCATCTTTGGGAGCGGATCTTG	

上記原案は *du*t⁻, *un*g⁻である *E. coli* の株、すなわち株 C J 236 において製造した DNA 鋳型を使用する (Kunkel, T. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:488-492 (1985)), 及び Kunkel, T., *Meth. Enzymol.*, 154:367-382 (1987))。DNA 鋳型は特定の位置に少量のウランの残基を含む。

【0076】突然変異誘発プライマーをインビトロで伸ばした後、部分的な増殖 DNA を *du*t⁻, *un*g⁻である *E. coli* の株、すなわち TG-1 にトランスフェクトした (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England (1984))。鋳型らせん中のウランの残基を酵素ウラン-N-グリコシラーゼの作用によりインビトロで除去した。これにより鋳型らせんに致死損傷が加えられ、変異株を迅速に、及び有効に回収することができる。

【0077】特に、ウラン含有鋳型 DNA を上に示した 5' ホスホリル化突然変異誘発プライマーにアニールした。プライマーの伸長は *E. coli* DNA ポリメラーゼのオリゴヌクレオチドを用いて 15°C にて 12-16 時間行った。新規に合成したらせんを *Ex*ta[®] DNA リガーゼを用いて突然変異誘発プライマーの 5' 末端に連結し、不適正を持つ環を形成した。得られた DNA を用いて *E. coli* 株 TG-1 (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England (1984)) のトランスフェクションを行い、多くのプラークから一重鎖 DNA を製造した。これらの DNA の配列を完全に決定した。その後立証された変異株の複製型 2 重鎖 DNA を *Eco*R I による消化、及び 1-2% (w/v) アガロースゲルによる電気泳動により単離した。下記に詳細に記載する通り、変異を含むこれらのフラグメントを使用して問題の t-PA 変異株をコードする t-PA cDNA のクローニングを構築した。

【0078】C. 変異株 t-PA のための発現ベクターの構築

プラスミド pSVT7 (RI⁺) の t-PA における t-PA の変異株は以下のようにして構築した。t-PA cDNA の中心 472 塩基対 *Eco*R I フラグメントを *Eco*R I による消化、及び 1-2% (w/v) アガロースゲルによる電気泳動により pSVT7 (RI⁺) の t-PA から除去した。その後残ったプラスミド DNA の直線状フラグメントをオリゴヌクレオチド-媒介-

突然変異誘発によって作った 472 塩基対フラグメントのバージョンに連結した (図 4 を参照)。得られたプラスミドを pSVT7 (RI⁺) の t-PA (R₃₀₄-E), pSVT7 (RI⁺) の t-PA (R₃₀₄-E), 及び pSVT7 (RI⁺) の t-PA (Del₂₉₆₋₃₀₂) と称した。

【0079】*E. coli* 株 DH-1 (Hanahan, D. 等, *DNA Cloning*, 1 巻, 出版: Glover, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 頁 109-135 (1985)) を上記の変異株プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれ pSVT7 (RI⁺) の t-PA (R₃₀₄-E), [DH-1]; pSVT7 (RI⁺) の t-PA (R₃₀₄-E) [DH-1]; 及び pSVT7 (RI⁺) の t-PA (Del₂₉₆₋₃₀₂) [DH-1] と称した。正しいフラグメントの存在は適した放射標識突然変異誘発オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成により確認し、フラグメントの配向は適した突然変異誘発オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた制限マッピング、及び DNA 配列決定により確認した。

【0080】pSVT7 (RI⁺) の t-PA (R₃₀₄-E), [DH-1]; pSVT7 (RI⁺) の t-PA (R₃₀₄-E) [DH-1]; 及び pSVT7 (RI⁺) の t-PA (Del₂₉₆₋₃₀₂) [DH-1] は American Type Culture Collection にそれぞれ ATCC 番号 67894, 67896 及び 67895 として供託した。

【0081】D. COS 細胞のトランスフェクション
次に 100mm の皿当たり約 10⁶ 個の COS 細胞 (G. Iuzman, Y. 等, *Cell*, 23:175-182 (1981)) をアルカリリソ法により精製した。1.0 µg の適したプラスミド DNA を用いてトランスフェクトした (Maniatis, T. 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 1 版, Cold Spring Harbor (1982))。特に、吸引により培地を COS 細胞から除去し、単層を 10mM の HEPES (pH 7.15) (Sigma Chemical Co.) を含む 5.0ml のカルシウムの培地 (GIBCO, Inc.) で 1 回洗浄した。洗浄液を除去した後、300 µg の DEAE-デキストラン (Pharmacia, Inc.) を含む 1.5ml の洗浄液中の単層にプラスミド DNA を加えた。その後単層を 0.0% の CO₂ を含む湿潤大気中、37°C にて 1 時間インキュベートした。この間 20 分毎に単層をおたやうに攪拌した。

単層をプラスミドDNAに1時間暴露した後、10mMのHEPES (pH 7.15) を含むダルバッコの培地で1回洗浄し、10% (v/v) の牛胎児血清 (GIBCO, Inc.) を含む10mlのダルバッコの培地、及び100 μ Mのキヌリン (Sigma Chemical Co.) を加えた。その後単層を上記に従い37°Cにて4時間インキュベートし、牛胎児血清を含まず10mMのHEPES (pH 7.15) を含むダルバッコの培地5.0mlで2回洗浄した。その後10% (v/v) の牛胎児血清を含む10mlのダルバッコの培地を加え、単層を上記に従い37°Cにて12時間インキュベートした。そして単層を牛胎児血清を含まないそれぞれ5.0mlのダルバッコの培地で3回洗浄し、同培地中、37°Cにてさらに30-60時間インキュベートした。DEAE-セキスランを含む溶液からプラスミドDNAを省略する以外は同様の方法で偽-トランスフェクション細胞を処理した。インキュベーション期間の最後に上置み培地を細胞から集めて下記に従い分析した。

【0082】E. 固相ラジオイムノアッセイによる野生型、及び変異t-PAの定量

固相ラジオイムノアッセイは基本的にインフュゼンザH Aに関して記載されている方法に従い (Gething, M. J., 等, *Nature*, **293**: 620-625 (1981))、精製ヒトt-PAに対するうさぎの抗血清の1g Gフラスコを用いて行い、COS細胞中の製造された野生型、及び変異t-PAの量を定量した。この方法によって決定したt-PAの濃度は0.5-1.0 μ g/mlであった。

【0083】F. 野生型、及び変異t-PAの酵素によるアッセイ

COS細胞中に製造された野生型、及び変異株t-PAの活性を決定するため、間接的色素顕微法を行った。このアッセイにおいては、遊離のp-ニトロアニリンが色素検出法の基質、スペクトルサイムPL (H-D-フルロキシムヘキサヒドロクロニル-p-ニトロアニリド、二酢酸塩) (American Diagnostica, Inc.) から、プラスミノーゲン上のt-PAの作用により生成されたプラスミンの作用により放出される。遊離のp-ニトロアニリンの放出は分光光度分析によりOD_{405nm}にて測定した。

【0084】特に、150-200pgの試験するべきt-PA、0.4mMのスペクトルサイムPL、0.1 μ MのLys-ブラスミノーゲン (American

Diagnostica, Inc.)、及び0.5-25 μ g/mlの可溶性フィブリン (Des-A-フィブリンノーゲン) (American Diagnostica, Inc.) を50mMのトリス-HCl (pH 7.5)、0.1MのNaCl、1.0mMのEDTA及び0.01% (v/v) のイオン80から成る緩衝液中に含む反応混合物を96ウェルの平底マイクロタイプレート (Costar, Inc.) 中で37°Cにてインキュベートし、2時間の間15又は30分間隔でBio-tekマイクロプレートリーダーを用いてOD_{405nm}を測定した。偽-トランスフェクション細胞からの緩衝液、又は適切に希釈した試料のアリコートを標準として分析し、得られたOD値 (50.01単位) を対応する試験値から差し引いた。各々のOD値を30分と60分の間の光学濃度の変化として、すなわち反応の遅滞期、及び1本鎖t-PAから2本鎖の形態への完全な変換による変化として測定した。標準的アッセイに使用する条件下で (0.1 μ MのLys-ブラスミノーゲン及び25 μ g/mlのDes-A-フィブリンノーゲン)、可溶性フィブリンはt-PAの活性を20-40倍賦活した。結果を図5に示す。

【0085】図5に示す通り、上記の本発明のt-PA変異株の3種類全部が酵素として活性であり、その活性の特異性は野生型の活性と大きく異なるものではないことが見出された。さらに上記の本発明のt-PA変異株は野生型t-PAと類似の方法でDes-A-フィブリンノーゲンの濃度の変化に応答することが見出された。Des-A-フィブリンノーゲンによる最適刺激は20-40倍であった。これはDes-A-フィブリンノーゲン製造を用いた野生型t-PAについての他の観察と一致する (Karlan, B., 等, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **142**: 147-154 (1987))、それぞれの場合、Des-A-フィブリンノーゲンの濃度が約1.0 μ g/mlの場合に最も最適刺激が起きた。

【0086】次に飽和濃度のDes-A-フィブリンノーゲン (25 μ g/ml)、及び種々の濃度 (0.02-0.16 μ M) の基質、Lys-ブラスミノーゲンの存在下における種々の形態の酵素のアッセイにより、野生型及び変異株t-PAのK_m及びK_{cat}値を決定した。結果を表Xに示す。

【0087】

表X

K _m (μ M)	K _{cat} (s ⁻¹)
0.024	0.22
0.019	0.23
0.023	0.22
0.029	0.17

上記の表に示す通り、異なるt-PA変異株に関するK_m及びK_{cat}値は互いに類似していた。又、それらの値は

Boose, J. 等, *Biochem.*, **28**:635-643 (1989); 及び Heylaerts, M. 等, *J. Biol. Chem.*, **257**:2912-2919 (1982) により報告されている野生型 t-P A に関する値とも類似している。

【0088】図5及び表Xに示されたデータは(1) t-P A のアミノ酸 296-302 の欠失、及び(1') 304位のArgのSer又はGluへの置換が、ブラズミンゲンを活性化する、及び可溶性フーリン・フラスメントにより賦活される t-P A の能力にほとんど影響しないことを示している。

【0089】アミノ酸 296-302 の欠失、及び Arg₃₀₄ の置換が t-P A と PAI-1 の相互作用に影響するかどうかを調べるために、それぞれ 250 pg

(3.8 フェントモル) の野生型、及び変異株 t-P A を 0-480 フェントモル (femtomoles) の部分的に精製した組み替え PAI-1 と共に 20 分間予備的にインキュベートした。その後上記の間接的色素測定法により残留酵素活性を測定した。部分的精製組み替え PAI-1 は上記の実施例2に記載にしたがって得た。結果を図6に示す。

【0090】図6に示す通り、3種類の本発明の t-P A 変異株のすべてが野生型 t-P A と全く異なる挙動を示した。すなわち野生型 t-P A (■) が PAI-1 により完全に阻害される条件下で(24 フェントモルの PAI-1)、欠失変異株 t-P A (De1₂₉₆₋₃₀₂)

(○) はその活性の約95%を保持していた。高濃度の PAI-1 (480 フェントモルの PAI-1) が存在する場合に初めて変異株 t-P A (De1₂₉₆₋₃₀₂)

(○) の酵素活性がかなりの減少を示した。2種類の置換変異株、すなわち t-P A (R₃₀₄→S) (□) 及び t-P A (E₃₀₄→E) (□) も程度は異なるが PAI-1 による阻害に対して抵抗性であった。又、図6に示す通り、Arg の代わりに Ser 又は Glu を含む2種類の置換変異株がその酵素活性の半-最速阻害に要する PAI-1 の量は野生型 t-P A のそれぞれ4及び2.5倍であった。

【0091】上記データは、アミノ酸 296-302 及び 304 が t-P A の酵素機能に含まれておらず、同種のセリン・プロテアーゼ・インヒビター、PAI-1 と酵素の相互作用に重要な役割を果たすことを示している。

モデルとしてトリプシンの構造を用いて、これらのアミノ酸がセリン・プロテアーゼの活性部位の近辺、及び触媒性3回回転軸からある程度離れた位置にあることが予想される。したがって t-P A と PAI-1 の接触面積は t-P A とその本質の基質であるブラズミンゲン・相互作用より広い。

【0092】変異株 t-P A (De1₂₉₆₋₃₀₂) もヒトの血漿中に存在するセリン・プロテアーゼ・インヒビターの複合混合物に対して抵抗性を示すかどうかを調べる

ために、上記の原案において部分的精製組み替え PAI-1 をヒトの血漿の 1:100 希釈液に置換した。この条件下で野生型 t-P A の活性の約70%が阻害されたが t-P A (De1₂₉₆₋₃₀₂) の活性は影響を受けなかった。

【0093】さらに野生型 t-P A 及び t-P A (De1₂₉₆₋₃₀₂) を、希釈しないヒトの血漿と共にインキュベートし、混合物を酸性化して pH5.0 とし、12,000 x g で5分間遠心した。透明になった上澄みを希釈し、残留 t-P A 活性に関して分析すると変異 t-P A (De1₂₉₆₋₃₀₂) の場合90%であり、野生型 t-P A の場合20%以下であった。上記の結果は変異 t-P A (De1₂₉₆₋₃₀₂) がヒトの血漿中に存在するセリン・

プロテアーゼ・インヒビターの複合混合物に対して抵抗性であることを示しており、したがって治療薬として野生型 t-P A より優れていると推定される。

【0094】G. 別の t-P A 変異株

上節Fに示したデータは、t-P A の残基 296-302 及び 304 が酵素、及び同起酵の阻害剤、PAI-1 の相互作用に重要な役割を果たすが、基質、Lys-ブラスミンゲンとの相互作用には影響しないことを示す。トリプシンの周知の構造に基づいて t-P A の触媒ドメインのモデルリングは、残基 296-302 が酵素の活性部位の端において表面ループを形成することを示唆している。このループは正の高い電荷を帯びている。節A及びFで議論した通り、この領域の効果が PAI-1 との静電的結合の形成に媒介されているという考えが本発明において提出された。この仮定を試験するために、ループ内の帯電した残基のそれぞれを変え、酵素の PAI-1 との相互作用に与えるその変異の結果を下記に従って評価した。ループ中の正に帯電した残基がセリン・プロテアーゼ・インヒビター、PAI-1 の相補的領域と塩橋を形成するならば、負に帯電した残基で置換すると、これらの2個のタンパク質の会合の際に同一に帯電した残基が並列するため t-P A と PAI-1 の相互作用は崩壊すると予想される。

【0095】特に、節Bに記載した要領で特定部位の突然変異誘発を行い、Lys₂₉₆、Arg₂₉₈、又は Arg₂₉₉ が Glu 残基により置換された t-P A 変異株をコードする cDNA の構築に使用した。これらの3個の残基のすべてが Glu に置換された t-P A の3重変異株をコードする cDNA を構築した。さらに2個の cDNA を製造した；ひとつは His₂₉₇ が Tyr 残基により置換された t-P A 変異株をコードし、他方は Pro₃₀₁ が Gly により置換された酵素をコードする。

【0096】これらの t-P A 変異株の構築に使用した6種類の突然変異誘発プライマーの配列は以下である

t-PA (K₂₉₆→G) (E) 5'-ATCTTTGCCGAGCACAGGA-3'
t-PA (H₂₉₇→Y) (E) 5'-TTTGCCAACTACAGGAGGT-3'
t-PA (E₂₉₈→G) (E) 5'-GCCAAGCAAGAGAGTGGCC-3'

t-PA(R₂₉₉→E):5'-AAGCACAGGGAGTCGCCCGG-3'

t-PA(P₃₀₁→G):5'-AGGAGGTCGGCGGAGAGCG-3'

t-PK(R₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E):

5'-GGCAATCTTGCCGAGCACGAGGAGTCGCCCGGAGA-3'

変異酵素 t-PA (K₂₉₆→E), t-PA (H₂₉₇→Y), t-PA (R₂₉₈→E) 及び t-PA (P₃₀₁→G) を上記の要領で遷移発現ベクター pSVT (RI⁻) に連結した。

【0097】変異酵素 t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E), 及び t-PA (R₂₉₉→E) をコードする cDNA を遷移発現ベクター pSTE に連結した。pSTE は pSVT7 の誘導体であり、pSTIV7 の 350bp ClaI-HindIII プロモーター・ポリリン・フラグメントを SV40 csl085 のプロモーター・ポリリン領域からの 418bp HpaI-HindIII フラグメントで置換することにより構築した (Dimario, D. 等, *J. Mol. Biol.*, 140:129-142 (1980))。

【0098】得られたプライマーを pSVT7 (RI⁻) / t-PA (K₂₉₆→E), pSVT7 (RI⁻) / t-PA (H₂₉₇→Y), pSVT7 (RI⁻) / t-PA (R₂₉₈→E), pSTE7 (RI⁻) / t-PA (R₂₉₉→E), pSVT7 (RI⁻) / t-PA (P₃₀₁→G), 及び pSTE7 (RI⁻) / t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E) と称した。

【0099】E. coli 株 DH-1 (Hanahan, D. 等, *DNA Cloning*, 1巻, Glover, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 頁109-135 (1985)) を上記の変異プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれ pSVT7 (RI⁻) / t-PA (K₂₉₆→E) [DH-

1], pSVT7 (RI⁻) / t-PA (H₂₉₇→Y) [DH-1], pSVT7 (RI⁻) / t-PA (R₂₉₈→E) [DH-1], pSTE7 (RI⁻) / t-PA (R₂₉₉→E) [DH-1], pSVT7 (RI⁻) / t-PA (R₃₀₁→G) [DH-1], 及び pSTE7 (RI⁻) / t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E) [DH-1] と称した。正しいフラグメントの存在を、適した放射活性突然変異誘発オリゴヌクレオチドへのハイブリッド形成により確認し、フラグメントの配向を、適した突然変異誘発オリゴヌクレオチドをプライマーとして使用した制限マッピング、及び DNA 配列決定により確認した。

【0100】pSVT7 (RI⁻) / t-PA (R₂₉₈→E) [DH-1], pSTE7 (RI⁻) / t-PA (R₂₉₉→E) [DH-1], 及び pSTE7 (RI⁻) / t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E) [DH-1] を American Type Culture Collection にてそれぞれ ATCC 番号 68157, 68154 及び 68153 として供与した。

【0101】上記プラスミド DNA はその後上記の要領で CHO 細胞のトランスフェクションに使用した。得られた条件下の培地の析出液 (典型的には 1-300), 及び免疫精製酵素を両方を用いて上記の要領でアッセイを行った。

【0102】次に飽和濃度の Des-A-フィブリノーゲン (25 µg/ml) 及び種々の濃度 (0.02-0.16 µM) の基質, Lys-β-カスミナーゼの存在下における種々の形態の酵素のアッセイにより野生型、及び変異株 t-PA の K_m 及び K_{cat} 値を決定した。結果を下表 X1 に示す。

【0103】

表 X1

酵素	K _m (µM)	K _{cat} (s ⁻¹)
野生型 t-PA	0.024	0.22
t-PA (K ₂₉₆ →E)	0.026	0.22
t-PA (H ₂₉₇ →Y)	0.017	0.14
t-PA (R ₂₉₈ →E)	0.027	0.24
t-PA (R ₂₉₉ →E)	0.033	0.26
t-PA (P ₃₀₁ →G)	0.027	0.24
t-PA (K ₂₉₆ , R ₂₉₈ , R ₂₉₉ →E, E, E)	0.027	0.24

上記の表 X1 のすなわち通り、上記で議論したいずれの変異株 t-PA とその基質との相互作用を変化させなかった。

【0104】同様に図 7 に示したデータは、変異株 t-PA とその正しいエフェクターである Des-A-フィブリノーゲンとの相互作用を変えなかったことを示している。逆に図 8 に示したデータは野生型 t-PA と変異 t-PA のいくつかの挙動における明確な差を示してい

る。特に 3 種類の変異株 t-PA、すなわち t-PA (R₂₉₈→E), t-PA (R₂₉₉→E) 及び t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E) の場合、セムリン PAI-1 と正常に相互作用する能力が実質的に変化した。特に三重変異株の挙動は顕著である: 200 倍モル以上過剰の PAI-1 と共に予備的インキュベーションを行った後でさえ活性の損失を示さない。これらの発見は t-PA の表面ループ、すなわち残基 396-3

0.2が特異的に同起源の阻害剤PAI-1と相互作用するという提案を支持しており、この相互作用にArg₂₉₈及びArg₂₉₉が含まれることを示唆している。これらの観察はt-PA、及びPAI-1の間の特異的相互作用に静電的結合が関与するという仮定を満足する。これらの相互作用に含まれるt-PAの残基はArg₂₉₈、Arg₂₉₉及びArg₃₀₄である。

【0105】実施例2

PAI-1変異株

本実施例に記載する方法はセリン・プロテアーゼとしてt-PAを、及びセリン・プロテアーゼ・インヒビターとしてPAI-1を使用する場合を対象としているが、上記のようなキモトリプシン・スーパーファミリーの他のセリン・プロテアーゼ、及び上記のような他のセリン・プロテアーゼ・インヒビターを、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく本文の方法を用いて容易に使用することができる。

【0106】A. 真核細胞における遺伝子発現PAI-1の発現、精製、及びアッセイ

PAI-1をコードする3.2 kb及び2.2 kb mRNAから誘導した種類のcDNAクローン(Ny, T.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6776-6780 (1986))、及びPannekoek, H.等, EMBO J., 5:2539-2544 (1986))を使用して哺乳類をモデルとする中で全長のcDNAを構築した。第1のクローンは、ラムダPAI-1は、ヒトの胎盤性cDNAライブラリからヌクレオチドにより得たcDNAの末端を切り取ったベクターであり(Dr. Carol Mendelson, Center, Department of Biochemistry, Southwestern Medical Center, Dallas, TXより提供) PAI-1の以下のヌクレオチド配列に対応する合成オリゴヌクレオチドを有する(AVDQLTR L)(Ny, T.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6776-6780 (1986))；及びPannekoek, H.等, EMBO J., 5:2539-2544 (1986))、EcoRIを用いた消化によりこのクローンから放出されるDNAのフラグメントはNy, T.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6776-6780 (1986)に報告されているPAI-1配列のヌクレオチド147-2013に対応した。このフラグメントをプラスミドベクターpUC18(Yanisch-Perron, C.等, Gene, 33:103-119 (1985))にサブクローニングし、組み替えプラスミドpPAI-1を得た。このプラスミドからの挿入を、バクテリオファージラムダgt11に構築したヒトの内皮細胞cDNAライブラリのヌクレオチドに使用した(Huynh, T.等, DNA Cloni-

ng, 1巻, 出版: Glover, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 頁49-88 (1985))。このようにして単離したcDNAクローンのひとつ、すなわちラムダPAI-1-11Aは、5'末端に2個の異なるヌクレオチドが存在する以外既報の(Pannekoek, H.等, EMBO J., 5:2539-2544 (1986)) PAI-1 cDNAと同一配列の挿入を持つ。このクローンの5'末端ヌクレオチド5'-1479から誘導したEcoRI-Bgl1117フラグメントをpPAI-1の3' Bgl111-EcoRIフラグメントに融合させ、pPAI-1-RBRを得た。

【0107】哺乳類細胞におけるPAI-1の発現に使用したSV40ベクターは以下の要領で構築した。pPAI-1-RBRから放出されたEcoRIフラグメントの末端にE. coli DNAポリメラーゼのクローニングフラグメントを導出し、合成XbaIリンカーに連結し、プラスミドpSVcat-PA3中のt-PAフラグメントの代わりに挿入し、pSV_L-PAI-1を得た(Sambrook, J.等, Mol. Biol. Med., 3:459-481 (1986))。SV_L-PAI-1の株を製造し、Doyle, C.等, J. Cell. Biol., 105:704-714 (1985)に記載の要領で増殖させた。

【0108】以前にPannekoek, H.等, EMBO J., 5:2539-2544 (1986)及びGinsberg, D.等, J. Clin. Invest., 91:1673-1680 (1986)に記載されたPAI-1クローンはpPAI-1-RBRによりコードされる配列と同一配列のPAI-1タンパク質をコードし、SV_L-PAI-1の構築にpPAI-1-RBRの代わりに使用することができた。

【0109】CV-1細胞の単層を37°Cで成長させ、SV_L-PAI-1を注入した。24時間後、培地を血清を含まないダルビツコ培地(GIBCO, Inc.)に置換し、さらに48時間インキュベーションを続けた。その後分泌されたPAI-1を含む上清を培地を0.45ミクロンのフィルター(Nalgene Co.)を通して濾過した。Nonidet P40(Sigma Chemical Co.)、及び1.0Mのリン酸ナトリウム(pH 7.2)緩衝液をそれぞれ0.1% (v/v)、及び1.0mMの濃度まで加えた。安定化した培地を、2.0mMのリン酸ナトリウム(pH 7.2)、13.5mMのNaCl、7.0mMのKClから成る緩衝液(後文では「PBS」)を用いて1時間当たり5.0mLの流量で平衡化したコンカナバリンA-セファロース 4Rのアフィニティーカラム(充填床容量1.0mL)に適用した。カラムを0.1% (v/v)のNonidet P40を含むPBS、2.5容量、0.1% (v/v)のNonidet P4

0.、及び1.0MのNaClを含むPBS25容量、及び最後に20mMのリシン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)10容量で連続的に洗浄した。結合PAI-1は20mMのリシン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)中の0.5Mのアルファ-メチル-D-グルコン酸(Sigma Chemical Co.)で特異的に溶解した。PAI-1を含む留分(上記間接的色素結合法においてCalbiochem, Inc.からのウリキナーゼの阻害により分析して)をブーヤした。その後Nonidet-P40を0.1%(v/v)の濃度まで加えてブーヤした溶離物1ml当たり0.57gのグアニン・ヒドロコリグ(U. S. Biochemicals)を加えた。このようにして得た部分的精製PAI-1を20mMのリシン酸ナトリウムから成る緩衝液(pH7.2)、及び10%(v/v)のグリセロールに対して透析し、使用まで-80℃にてアリクートとして保存した。

【0110】このようにして製造したPAI-1は40

μg./mlの全タンパク質(Biorad, Inc.販売によるBradfordの試験により分析)、及び12.5%(w/v)のSDS-ポリアクリルアミドゲルの染色により分析して15μg./mlのPAI-1を含んでいた。ウリキナーゼ(それ自身は³H-インプロピルアルサロホスファート(New England Nuclear, Inc.)からのNET-065)を用いた滴定により活性(50%)に対する滴定により、本文の記載に従って製造したPAI-1の活性は16.6%であり、活性PAI-1の濃度は48nMであることが明らかになった。

【0111】B. 突然変異誘発のためのPAI-1部位の選型

PAI-1の残基Glu₃₅₀及びGlu₃₅₁がt-PAと相互作用するといふ仮定を試験するため、特定オリゴヌクレオチドの突然変異誘発を使用して下表X11に示すPAI-1の2種類の変異株を形成した。

【0112】

表X11

野生型 PAI-1	346・	・355
PAI-1 (E ₃₅₀ →R)	RMAPEE11MD	
PAI-1 (E ₃₅₁ →R)	RMAPRE11MD	

変異株PAI-1 (E₃₅₀→R)、及びPAI-1 (E₃₅₁→R)はそれぞれGlu₃₅₀及びGlu₃₅₁のArgへの置換を含み、色に荷電したGlu残基を色に荷電したArg残基に代え、t-PA (R₃₀₄→E)に存在する負に荷電したGlu残基との有効な相互作用を促進するために選択的に選んだ。置換がt-PAの残基Arg₃₀₄を導入された特異的変異と相補的であれば、Glu₃₅₀をt-PA (R₃₀₄→E)変異株などとの相互作用が強化されたPAI-1を形成する他のいろいろな置換基に、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく置換することができた。

【0113】C. PAI-1のオリゴヌクレオチド-媒介突然変異誘発

第1に、メチオニールPAI-1を直接発現し、1方で発現ベクターからのシグナル配列及びcDNAの3'非翻訳領域を除去するための、プラスミド-pPAIST7と称するPAI-1発現プラスミドの構築が必要であった。この達成のため、合成DNAリナーを使用してPAI-1コード配列の両末端の再構築、及び成熟PAI-1の第1残基をコードするトリグレットの直前にATタンパク質合成開始コードの導入を行った。さらにプラスミドpBR322へのcDNAコード領域の挿入を容易にするため、PAI-1のcDNAフラグメントのそれぞれ5'及び3'末端に、EcoRI及びHindIII制限エンドスクリーゼ認識部位を形成するリ

ンカーを設計した。

【0114】特にApaLI及びPfiMIを用いてpPAI-1-RBRを消化することによりプラスミドpPAIST7を得た。得られたPAI-1の残基1のための2bpのコード、及び379残基タンパク質の残基2-378のための全コード配列を含む1127bpフラグメントをゲル電気泳動により精製した。次に合成リナー(5'末端にて10bp、及び3'末端にて13bp)を1127bpApaLI、及びPfiMI-DNAフラグメントと連結し、EcoRI及びHindIIIを用いて消化し、1146bp-EcoRI-及びHindIII-消化DNAフラグメントをゲル電気泳動により分離した。その後このフラグメントをEcoRI-及びHindIII-消化pBR322にクローニングした。

【0115】発現プラスミドの構築の開始のために、サブクローンをEcoRIで消化し、直鎖型プラスミドを細菌のアリクホスファターゼを用いて脱アホリル化した。その後trpプロモーター、及びリボソーム結合部位を含むpCSA-48からの360bp-EcoRI-DNAフラグメント(Franke, A.等, Meth. Enzymol., 162: 653-668 (1988))を用いて、二フラグメントを連結することによりPAI-1発現プラスミドを構築した。次に、得られたプラスミドを用い、Maniatis, T.等, Mo-

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第1版, Cold Spring Harbor (1982)に記載の要領で E. coli の形質転換を行った。得られた形質転換物のプラスミドDNAをHindIIIを用いた制限分析によりtrpプロモーターフラグメントの存在、及び配向に関してスクリーニングを行った。多くの形質転換物がtrpプロモーターに隣接して阻害剤の直接の発現に必要な立体配置でPAI-1遺伝子を持つプラスミドを含むと同定された。それらのプラスミドのひとつをpPAIST7と称した。

【0116】アミノ酸残基Val₂₈₄からPro₃₇₉までをコードするPAI-1のヌクレオチド配列を含むプラスミドpPAIST7のSalI-HindIIIフラグメントをSalI-HindIII消化複製型M13mp18 (図9を参照)に連結した。連結DNAをE. coli株TG-1 (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England (1984))を上記変異プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれpPAIST7HS [DH-1], pPAIST7HS (E₃₅₀->R) [DH-1], 及びpPAIST7HS (E₃₅₁->R) [TG-1]と称した。正しいフラグメントの存在を適した放射標識突然変異誘発オリゴヌクレオチドプライマーを用いて導入した (図9を参照)。これらのPAI-1変異体の構築に使用した2個の突然変異誘発プライマーの配列は以下である:

PAI-1(E₃₅₀->R) 5'-TGATGATCTCTGGGG-3'
PAI-1(E₃₅₁->R) 5'-CCATGATGATCTCTGGGG-3'

得られたPAI-1 cDNAの変異株SalI-HindIIIフラグメントの配列を完全に決定した。立証された変異株のDNAの二重鎖複製型を単離し、変異290塩基対SalI-HindIIIフラグメントをSalI-HindIII消化、及び6.0% (w/v) の非変性ポリアクリルアミドゲルを通した電気泳動により単離した。下記に詳細に記載する通り、変異を含むこれらのフラグメントを使用し、問題のPAI-1変異株をコードするPAI-1 cDNAの構築を再構築した。

【0118】D. 変異株PAI-1のための発現ベクター構築
プラスミドpPAIST7HS (ヌクレオチド対1におけるHindIII部位、及びヌクレオチド対2106におけるSalI部位の欠落したプラスミドpPAIST7の誘導体であり、PAI-1 cDNAコード配列における変異SalIのHindIIIフラグメントへの交換を容易にするために構築された)におけるPAI-1変異株を以下の要領で構築した。PAI-1 cDNAの中心290塩基対SalIからHindIIIまでのフラグメントをSalI及びHindIII

Iを用いた消化、及び1.0% (w/v) アザローズゲル電気泳動によりプラスミドpPAIST7HSから除去した。その後、ホーターDNAの残留直鎖フラグメントを特定オリゴヌクレオチドの突然変異誘発で製造した上記の290塩基対SalIからHindIIIフラグメントの変異株バージョンに連結した (図9を参照)。得られたプラスミドをpPAIST7HS (E₃₅₀->R) 及びpPAIST7HS (E₃₅₁->R) と称した。

【0119】E. coli株DH-1 (Hanahan, D. 等, DNA Cloning, 1巻, 出版: Oxford, D. M., I. R. L. Press, Oxford, 1989-1990 (1985))を上記変異プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれpPAIST7HS [DH-1], pPAIST7HS (E₃₅₀->R) [DH-1], 及びpPAIST7HS (E₃₅₁->R) [DH-1]と称した。E. coli株TG-1 (Gibson, T., Thesis, University of Cambridge, England (1984))を上記変異プラスミドを用いて形質転換し、得られた株をそれぞれpPAIST7HS [TG-1], pPAIST7HS (E₃₅₀->R) [TG-1], 及びpPAIST7HS (E₃₅₁->R) [TG-1]と称した。正しいフラグメントの存在を適した放射標識突然変異誘発オリゴヌクレオチドへのハイブリッド形成、及び核酸配列決定により確認した。

pPAIST7HS (E₃₅₀->R) [DH-1], 及びpPAIST7HS (E₃₅₁->R) [DH-1]をAmerican Type Culture CollectionにてそれぞれATCC番号C8155及びC68156として供託した。

【0120】E. 野生型、及び変異株PAI-1の発現、抽出、及びアッセイ

E. coli株pPAIST7HS [TG-1], pPAIST7HS (E₃₅₀->R) [TG-1], 及びpPAIST7HS (E₃₅₁->R) [TG-1]を、リアーナルタニバイオロン中で37℃にて飽和濃度まで終夜成育した。50mlの培養物を使用して、1リットル当たり6.0gのNa₂HPO₄, 3.0gのKH₂PO₄, 0.5gのNaCl, 0.5gのMgSO₄・7H₂O, 1.0gのNH₄Cl, 5.0gのカゼイノ酸, 1.0gのグルコース, 10.0mlのグリセロール, 1.0mgのチアミジンHCl, 及び2.5mgのアレキシンを含む修正M9培地 (pH 7.4) 50mlに接種した。250mlのアレーンメイヤーフラスコ中、37℃にて培養細菌を22時間成育した。抽出細胞を以下の要領で培養物から得た。

【0121】E. coliを遠心によりペレット化し、20mlの冷50mMトリス-HCl (pH 8.0), 及び1.0mM EDTA中で遠心により洗浄し、氷上

の3.6mLの同緩衝液中に再懸濁した。1mL当たり10mgのリゾチーム0.4mLを添加して20分間、0.1mLの10% (v/v) Nonidet P-40を添加して10分間、及び0.2mLの5.0M NaClを添加して10分間抽出を行った。超音器 (sonifier) (細胞切断器のマイクロチップを50%使用サイクル、及び設定7 (Branson Sonic Power Company) で使用して細胞を短く切断し、粘度を下げ、4℃にて30分間15,000xgの遠心を行った。透明な溶液に10% (v/v) までグリセロールを加え、PAI-1を含む抽出物を使用まで-80℃にてアリコーンとして保存した。

【0122】哺乳類細胞に発現したPAI-1に関して上記に記載した要領でウロキナーゼを用いて24℃にて3時間インキュベートすることにより、抽出物を活性PAI-1に関して測定した。野生型PAI-1、PAI-1 (E₃₅₀→R) 及びPAI-1 (E₃₅₁→R) の抽出物はそれぞれ8.03nM、5.93nM、及び16.2nMの活性PAI-1を含んでいた。

【0123】野生型、及び変異株t-PAと野生型、及び変異株PAI-1の相互作用の速度に関する速度論的測定を、0.1mMのEDTA及び0.1% (v/v) のノイオン20を含む0.1Mトリス-HCl緩衝液

(pH 7.4) 中、24℃にて行った。上記のt-PAに関する間接的色素結合法を用いて残留酵素活性を時間の関数として決定した。t-PAに対して過剰のPAI-1の偽-1次条件下で、時間に対する残留t-PA活性の直線状プロットを傾きから各阻害剤濃度に関して半減期 ($t_{1/2}$) を決定した。見掛けの速度定数 ($k_{app} = 0.693 / t_{1/2}$) を阻害剤濃度で割って速度定数、 k_1 を算出した。

【0124】60pMのt-PAの阻害の速度を、偽-1次条件下で0.6-10.0nMの範囲の阻害剤濃度にて研究した。t-PA-PAI-1混合物をマイクロタイタープレートウェル中、24℃にて種々の時間 (0-30分) 予備的にインキュベートし、その後Lys-ブラスチン、ブラスチン、スプレクトロザイム、PLI、及びDes-A-ブラスチン、ブラスチンをそれぞれ最終濃度300nM、0.4nM及び12.5μg/mLまで添加した。基質の添加後、マイクロタイタープレートで37℃にてインキュベートし、405nmに於ける吸収を2次間追蹤して残留t-PA活性を決定した。

【0125】野生型、及び変異株PAI-1による野生型、及び変異株t-PAの阻害の最高速度定数 ($M^{-1}s^{-1}$) を表X111に示す。

【0126】

表X111

	野生型	t-PA	t-PA
	t-PA	(R ₃₀₄ →S)	(R ₃₀₄ →E)
野生型PAI-1	1 x 10 ⁶	3 x 10 ⁵	1 x 10 ⁴
PAI-1 (E ₃₅₀ →R)	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁵
PAI-1 (E ₃₅₁ →R)	3 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵

上記の表X111に示す通り、PAI-1 (E₃₅₀→R) 及びPAI-1 (E₃₅₁→R) の両方とも、野生型PAI-1と比較してt-PA (R₃₀₄→E) との相互作用の速度定数が増加しており、変異によりセリン-プロテアーゼインヒビター抵抗性t-PA (R₃₀₄→E) の阻害に関するPAI-1の能力が復活したことを証明している。本発明を特別な具体化を参照して詳細に説明したが、種々の変異及び修正が本発明の精神、及び範囲から逸脱することなく可能であることが同業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】キモトリプシン-スーパーファミリーの種々のセリン-プロテアーゼの配列の比較を示す。配列は、保持されたアミノ酸の重複が示されるように並べた。トリプシン上の数字はプロテイン-データ-バンクのPDB 3ptp.ent エントリーで使用されている番号付

による。t-PA上の数字は成熟t-PA分子におけるアミノ酸による。

【図2】セリン-プロテアーゼ-インヒビターのセルピシンファミリーの種々のメンバーの配列の比較を示す。配列は保持されたアミノ酸の重複がわかるように並べた。アルファ-1-アンチトリプシンの数字、及びPAI-1上の数字は成熟分子におけるアミノ酸残基による。

【図3】セリン-プロテアーゼ-インヒビターのセルピシンファミリーの種々のメンバーの配列の比較を示す。配列は保持されたアミノ酸の重複がわかるように並べた。アルファ-1-アンチトリプシンの数字、及びPAI-1上の数字は成熟分子におけるアミノ酸残基による。

【図4】野生型t-PA、及び本発明のt-PAのセルピシン抵抗性変異株の変異、及び発現に用いられたベク

ターの構築を図示したものである。

【図5】野生型 t-PA 及び t-PA のセルビナー抵抗性変異株の活性の間接的色素澱粉法における比較を示す。図5で■は野生型 t-PA を示し、○は t-PA (R₃₀₄→S) を示し、□は t-PA (R₃₀₄→E) を示し、+は t-PA (De 1₂₉₆₋₃₀₂) を示す。

【図6】間接的色素澱粉法による野生型 t-PA、及び t-PA のセルビナー抵抗性変異株の活性に対する PAI-1 の効果を示す。図6において、■は野生型 t-PA を示し、○は t-PA (R₃₀₄→S) を示し、□は t-PA (R₃₀₄→E) を示し、+は t-PA (De 1₂₉₆₋₃₀₂) を示す。

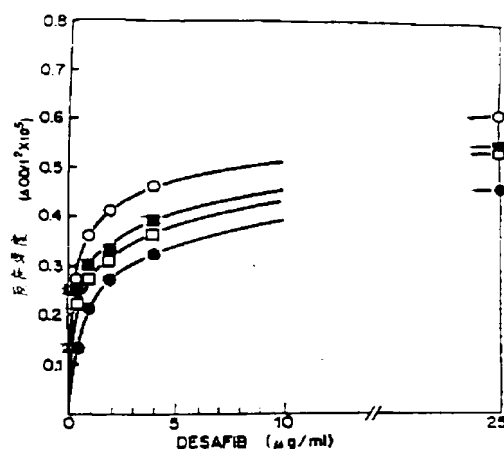
【図7】間接的色素澱粉法による野生型 t-PA、及び t-PA のセルビナー抵抗性変異株の活性の比較を示す。図7において、□は t-PA (H₂₉₇→Y) を示し、+は野生型 t-PA を示し、+は t-PA (K₂₉₆

→E) を示し、■は三重変異株 t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E) を示し、▲は t-PA (R₂₉₉→E) を示し、△は t-PA (R₂₉₈→E) を示し、○は t-PA (P₃₀₁→G) を示す。

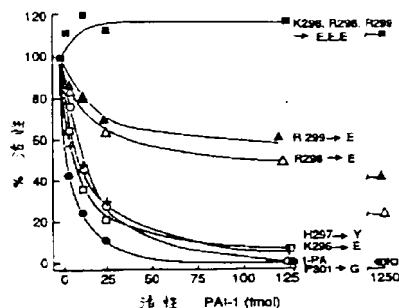
【図8】間接的色素澱粉法による野生型 t-PA、及び t-PA のセルビナー抵抗性変異株の活性に対する PAI-1 の効果を示す。図8において、□は t-PA (H₂₉₇→Y) を示し、+は野生型 t-PA を示し、+は t-PA (K₂₉₆→E) を示し、■は t-PA (K₂₉₆, R₂₉₈, R₂₉₉→E, E, E) を示し、▲は t-PA (R₂₉₉→E) を示し、△は t-PA (R₂₉₈→E) を示し、○は t-PA (P₃₀₁→G) を示す。

【図9】野生型 PAI-1、及び本発明の PAI-1 の変異株の変異、及び発現に使用したベクターの構築を図示したものである。

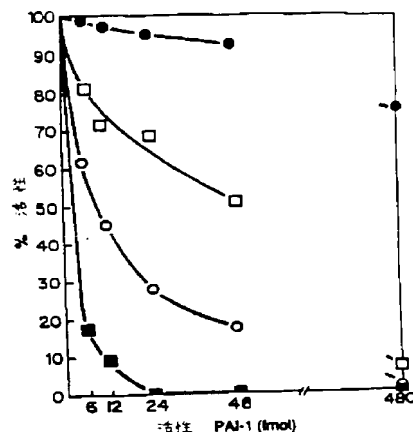
【図5】



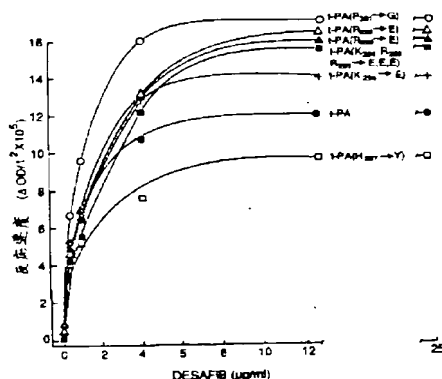
【図8】



【図6】



【図7】



【表1】

	16		39	50
トリプシン	IVGGYTGGAN TVFYQVSLNS	FCGGSLINSQ
TPA LT. 鎖	IKGGLEFADIA SHPWQAIFA	LCGGILISSC
ウロキナーゼ	IGGEFTTIEN Q.PWFAAIYR	VCGGSLMSPC
ブラスミン	VVGCCVAHPH SWPQVSLRT	FCGGTILISPE
プロテイン C	DQEDQVDPRL IDGKMTARGD	ACGAVLIHPS
トロンビン	IVEGQDAEVG LSPWQVMLFR	LCGASLISDR
	57			
トリプシン	WVSAABCYK S.....GIQV	RLGEDNINVV EG.NEQFISA
TPA LT. 鎖	WILSAABCFO ERFPPHHLTV	ILGR.TYRVV PGEEQKFEV
ウロキナーゼ	WVISATHCFI DYPKEDYIV	YLGR.SRLNS NTQGMKFEV
ブラスミン	WVLTAAACLE KSPRPSSYKV	ILGA.HQEVN LEPRVOEIEV
プロテイン C	WVLTAAACMD ESKCL.....V	RLGEYDLRW EKWEL.DLDI
トロンビン	WVLTAAACLL YPPWDK.....N	FTVDDLELRI GKHSRTYER
	102			
トリプシンPSYNS NTLNNDIMLI	KLKSA.....
TPA LT. 鎖EFDD DTYDNDIALI	QLKSDSSRCA QESSV.VRTV
ウロキナーゼDYSADT LAHNDIALI	KIRSKEGRCA QPSRT.IQTI
ブラスミンEPTKNDIALI	KLSSP.....
プロテイン CPNYSK STTDNDIALI	HLAQP.....
トロンビンIYIHPRYNWK ENLDRDIALI	KLKRP.....
	150			
トリプシンTQCL ISGWGNTKSS	GT.SYPDVLK CLKAPILSDS
TPA LT. 鎖DW.....TECE	LSGYGKHEAL SP.FYSERLK
ウロキナーゼFG.....TSCE	ITGFGKENST DY.LYFEQLK
ブラスミンDR.....TECF	ITGWGETQGT ...FGAGLLK
プロテイン CELNQAGQETL VTGWGYHSSR	E..KEAKRNR FVLNFIKIPV
トロンビンLLR.AGFKGR VTGWGNRRET	WTISVAEVOP SVLQVNLPL
	195 200			
トリプシンITSNMFC AGYL.EGG..KDSQCGD SGGPVVCS..
TPA LT. 鎖T...VTDMMLC	AGDTRSGCPQ ANLEDACQGD
ウロキナーゼE...VTTRMLC	AAD.....PQ .WKTDSCQGD
ブラスミンR...VQSTELC	AGEL.....
プロテイン CSNMVSENNLC	AGIL.....
トロンビンRIRITDRMFC	AGYK...PGE GFRGDACEGD
	214		245	
トリプシン	VSWGSGCAQK NKPGVYTRVC	NYVSNIKQTI ASN.....
TPA LT. 鎖	ISWGLGCGQK DVPGVYTRVT	NYLDWIRDNM RP.....
ウロキナーゼ	VSWGRCALK DKPGVYTRVS	BFLPWIRSH KEENGLAL..
ブラスミン	ISWGLGCGARP NKPGVYTRVS	RFVTWIEGVM RNN.....
プロテイン C	VSWGEGCGLL BNYGVYTRVS	RYLDWINGHI RDKEAPQKSW
トロンビン	VSWGEGCDRD GRYGYTYEVF	RLKKWIKQVI DRLG.....

[illegible]

```

150
PAI-1      NLLGKGAVDQ LTRLVLVNAL YPNGQWETPF PDSSTERRLF HKSDGSTVSV
Antitrypsin DLV...KELDR DTVFALVNYI FFRGKNERPF EVKDTKEEDF HVDQVTTVKV

200
PAI-2      PEGSVGDGDR MVLVNAVYFR GWNKTPFERK LNGLYFFPRV SAQRTFVOKR
A-chymotryp DLI...KDFOS QTRKVLVNYI FFKARWEMPF DPODTBQSRF YLSKRRKVRV
A2-antiplas EFLS...GLFE DTVLLLLNMI FPGGFWNKPF DPSTLQDQSF HLDQQTVPV
A-thrombIII DVIPSEAINF LTVLVLVMTI YFGLWNRKF SPENTTEKELF YKADGSCSA
HeparinCoII DALE...NIDF ATQMMLNCI YFSGWVYKPF PVETEMNMF RLNEREVVRV
Clnhhibitor RLDD...SLFS DTRLVLLNMI YLSAKNRTTF DPKKTEMEPF HFKNSVIKVP

250
PAI-1      PMMAQTNKFN YTEFTTFDGH YYDILELPYE GDTLSNFIAA FYEKE...VFL
Antitrypsin PMMERLGRFN IQHC.KELSS M...VLLNKYL GMANATFFLF DEGR.....L

250
PAI-2      YLREKLNIGY IEDLRAO... ILELPYAGDV SMFLLLPDEI ADVETGLELL
A-chymotryp PMSLNHLTI FYRDEELSC ...TVVELKYT GNASALFILP DQDK.....M
A2-antiplas EMQARTYPL NMFLLSQEI ...QVAFPFPE NMSFVVLVVF TE.....FEM
A-thrombIII SMYQSGKFR YRR...VAEGT ...QVLELPFK GDDITVVLIL FK.....PEK
HeparinCoII SMNQTGNFL AANDQELDCD ...ILQLEYV GGISKLIVVF ERM.....SGM
Clnhhibitor MNNSKRYFVA HFIDQTLKAK ...VGQLQL...S HNSLVLIVVF QNLK...HRL

300
PAI-1      SALTNILSAQ LISEWKNMT ...RLPRLVLV PKFLETEVD LR.KPLENLG
Antitrypsin QLENELTHD IITKPLENED ...RRASLKL PKLSITGYD LR.SVLGQLG

300
PAI-2      ESEITYDKLN KWTSEKMAE DEVEVYIPQF KLESEYELA SILRSAGRED
A-chymotryp ZEVEAMLLPE TLKRWDSLE P...REIGELYL PKFISRDYN LN.DILLQLG
A2-antiplas MVSQVLNLS WDTLPPFLVM ...SRPTKVEL PKLYLEKOND LV.ATLSQLG
A-thrombIII SLAKVEKELT FEVLQEWLDE LSEHMLVVM PRFIEDGFS LK.EQLQDNG
HeparinCoII KTLAQLTPE VVERWQKST ...NRTREVLV PKFLEKNTN LV.SELILMG
Clnhhibitor EDMQALSFS VFKAINKLE HSKPQPTLLT LPRIEVTTSQ DMSINERLE

350
PAI-1      KTDMPFQ... FOADPTSLD QEPLEVAQAL QEVKIEVNES GTVASSST...
Antitrypsin ITHVPSN... .GADLSGVTE EAPLELSKAV KEAVLTIDER GTEAAGAN...

350
PAI-2      AFNK...GRA NPSGSRND LFLSEVFEQA HVDVNEEGTE AAAGTGGV...
A-chymotryp IEKAPT... .RADLSGITC AMHLAVSQVV KEVVSDFPEE GTEASAA...
A2-antiplas LOELFQA... .PDLROISE Q.SLVVSGVQ HQTLELSEV GVEAAAT...
A-thrombIII LVDLFEPERS KLPQIVAGR D.DLTVSDAF KEAFLEVNEE GSEAAAT...
HeparinCoII IRLFLD... .KMGNAAGIS DQIAIDLPF ROQTITVNEE GTQATTVT...
Clnhhibitor FDFSYD... .LNLCLTE DFDLQVBAQ ROTVLELTET GVEAAAS...

400
PAI-1      AVIVSARMAP EE....IIND RFFLPVVRN PTOTVLFHQO VKSP.....
Antitrypsin FLEAIFHEIF FE....VKFN KFFVFLNIEQ NTKSPLFMGR VVNFQK...

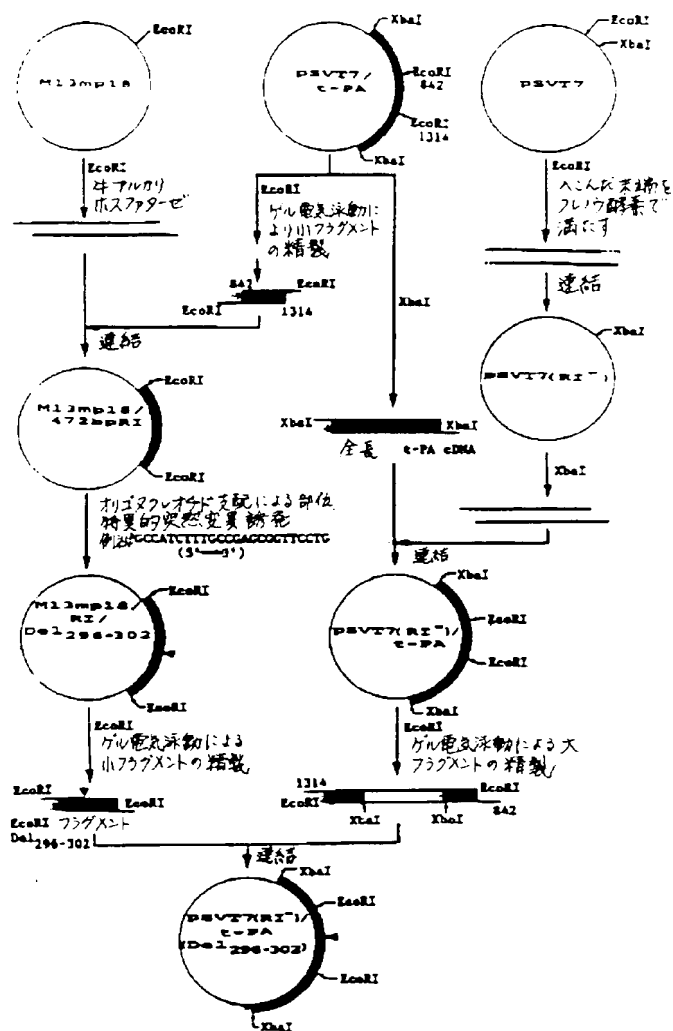
450
PAI-2      ...KTGETGE GGPO...FVAD HFFVFLINER ITKCILFFOR FCSF.....
A-chymotryp AVKITLLSAL VETRTIVRPN RFFLRIIVPT DTOMIFFMER VTNP.SRPRA
A2-antiplas .SIANSEKSL SE....FSVN RFFLFFIFED TTGLPLFVGS VRNPNPSAPR
A-thrombIII AVVIAGESLM PHEVT.FKAN RFFLVFIREV PLNTIIFMGR VANFCVR...
HeparinCoII TVGPKPLSTQ VR....FTVD RFFLFLIYER STSCLLFMGR VANFSRS...
Clnhhibitor .AISVARTLL V....FEVQ QFFLFLVNDQ QKFFVVFHGR VYDFRA...

500
PAI-1      .....
Antitrypsin .....

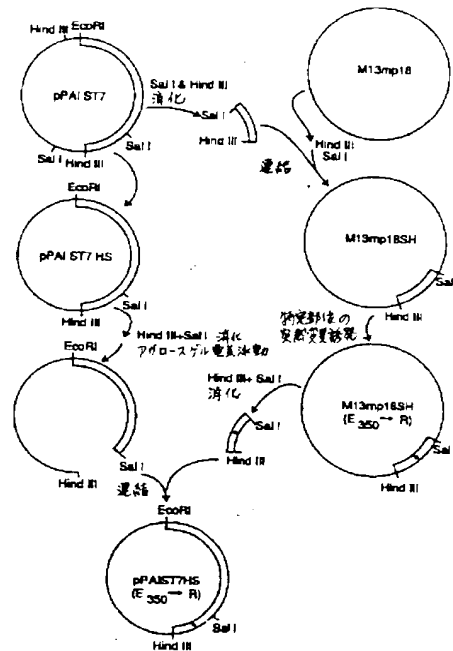
550
PAI-2      .....
A-chymotryp CIXQWGSQ .....
A2-antiplas ELKEQDSDPG HKDFLQSLAG YFRGDKLPQF DLKLVFPHEE DYPQPGSPK
A-thrombIII .....
HeparinCoII .....
Clnhhibitor .....

```

【図4】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 7,02

A 6 1 K 37/54

(C 1 2 N 9,64

C 1 2 R 1 91)

(72) 発明者 エドウィン・エル・マジンソン
アメリカ合衆国テキサス州75209ダラス・
アパートメント202・ボルドードライブ
6203

(72) 発明者 マリイジェイン・エイチ・ゲシング
アメリカ合衆国テキサス州75229ダラス・
アービンシモンズドライブ4320

(72) 発明者 エリザベス・ジェイ・ゴールドスミス
アメリカ合衆国テキサス州75209ダラス・
チエロキートレイル4626

(72) 発明者 ロバート・デイ・ジェラード
アメリカ合衆国テキサス州75252ダラス・
フエザークラウドドライブ18620